

STRUKTUR UND AKTIVITÄT DER
DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE
AUS VEGETATIVEN UND
SPORULIERENDEN ZELLEN VON
B.CEREUS T

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernhard Ulrich Rexer
aus Schärding

1976

STRUKTUR UND AKTIVITÄT DER DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE AUS VEGETATIVEN UND SPORULIERENDEN ZELLEN VON B. CEREUS T

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Ulrich Rexer

aus Schärding

1976



1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Zillig

2. Berichterstatter: Professor Dr. G.R. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.1976

Die
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..

... ..
... ..

Ursula
und meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1973 bis Herbst 1975 unter Anleitung von Professor Dr. W. Zillig im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Professor Zillig möchte ich sehr herzlich danken für die Anregung zu diesem Thema, die großzügige Förderung dieser Arbeit und für zahlreiche fruchtbare Diskussionen.

Herrn Professor Dr. V.R. Srinivasan, Baton Rouge, USA, schulde ich Dank für die Begeisterung, die er mir für die Probleme der Sporulation während seines Aufenthalts in Martinsried bis Juni 1973 vermittelt hat.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung von Professor Zillig bin ich durch viele Diskussionen verpflichtet; Herrn Dr. H. Prieß danke ich außerdem für die wertvolle Hilfe bei der Bestimmung des Molekulargewichts von ϕ CL-DNA über analytische Ultrazentrifugation.

Bei Frau G. Baer möchte ich mich für ihre gewissenhafte Assistenz bei einer Reihe von Experimenten bedanken.

Die Max-Planck-Gesellschaft hat mich durch die Gewährung eines Stipendiums unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	1
RESULTATE	10
1. Isolierung der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.cereusT	10
1.1. Isolierung aus vegetativen Zellen	10
1.2. Isolierung aus sporulierenden Zellen	14
1.3. Vergleich der Isolierung aus vegetativen und sporulierenden Zellen	20
2. Die Struktur der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.cereusT.	20
2.1. Zusammensetzung aus Untereinheiten	20
2.2. Stöchiometrie, Molekulargewicht	22
2.3. Die Struktur der RNA-Polymerase im Laufe der Sporulation	22
3. Die enzymatische Aktivität der DNA-abh. RNA-Polymerase aus B.cereusT	24
3.1. Abhängigkeit von DNA, Nukleosidtriphosphaten und Salzen	25
3.2. Abhängigkeit von pH, Temperatur und Zeit	28
3.3. Einfluß von Transkriptionsinhibitoren	31
3.4. Vergleich der enzymatischen Aktivität aus vegetativen und sporulierenden Zellen	33
4. Auftrennung des Enzyms in σ -Faktor und Minimalenzym	35
4.1. Chromatographie an Phospho-Cellulose	35
4.2. Elektrophoretische σ -Gewinnung	40
4.3. Vergleich der Minimalenzyme und σ -Faktoren aus vegetativen und sporulierenden Zellen	40
4.4. Überkreuzstimulierung von Minimalenzymen und σ -Faktoren verschiedener Organismen	42
5. Stadienspezifische Peptide, assoziiert mit DNA-abh.RNA-Polymerase oder DNA	45
5.1. Immunopräzipitation der DNA-abh.RNA-Polymerase	46
5.2. Begleitproteine während der Reinigung	48
5.3. Doppelstrang-DNA-bindende Proteine	49

	Seite
6.	Aktivität der DNA-abh.RNA-Polymerase in Rohextrakten 50
6.1.	Transkriptaseaktivität im kompletten Zellextrakt 53
6.2.	Transkriptaseaktivität im fraktionierten Zellextrakt 54
6.3.	Abtrennung einer Protease 57
6.4.	DNA-abh.RNA-Polymerase-Aktivität in Zellextrakten der proteasearmen Mutante B. cereusTC 62
6.5.	Transkription von B.cereusT-DNA in vitro 66
ANHANG	73
7.	Der B.cereusT-Phage ØCL 73
7.1.	Zucht und Reinigung 73
7.2.	Morphologie 76
7.3.	Die DNA des Phagen ØCL 77
7.4.	In-vitro-Transkription von ØCL-DNA 78
7.5.	Peptidmuster des Phagen ØCL 82
8.	Der σ -Faktor der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.stearothermophilus NU 10 83
8.1.	Isolierung und Struktur der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.stearothermophilus NU 10 84
8.2.	Auftrennung in Untereinheiten und Rekonstitution 88
8.3.	Darstellung eines Minimalenzym und Einfluß von σ 89
8.4.	Heparin und B.stearothermophilus-RNA-Polymerase 94
ZUSAMMENSTELLUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE	96
DISKUSSION	100
I.	Isolierung, Struktur und Eigenschaften der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.cereusT 100
II.	Änderung der Struktur der DNA-abh.RNA-Polymerase während der Sporulation? 103
III.	Änderung der Matrizenspezifität der DNA-abh.RNA-Polymerase während der Sporulation? 107
IV.	Ausblick 114
MATERIAL UND METHODEN	115
ZUSAMMENFASSUNG	126
LITERATUR	127
LEBENS LAUF	134

Abkürzungen

abh.	abhängig
ATP,CTP,GTP,UTP	Adenosin-, Cytidin-,Guanosin-, Uridin-5'-triphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
B.	Bacillus
B.c.	Bacillus cereusT
B.st.	Bacillus stearothermophilus NU 10
cpm	Impulse pro Minute
DEAE-Cellulose	Diäthyl-aminoäthyl-Cellulose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	doppelsträngige, native DNA
ss-DNA	einzelsträngige,denaturierte DNA
DNase	Desoxyribonuklease
E.	Escherichia
E.c.	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
L.	Lactobacillus
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
OD	optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
m,r,t-RNA	messenger, ribosomale, transfer-RNA
RNA-Polymerase	DNA-abh.RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
SDS	Dodecylsulfat, Natrium-Salz
Std.	Stunden
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehung pro Minute

ALLGEMEINE EINFÜHRUNG

Molekularbiologische Forschungen der Vergangenheit haben gezeigt, daß ein so grundlegender Vorgang wie die Ausprägung von genetischer Information in kernhaltigen, sog. eukaryontischen Zellen im Wesentlichen gleich abläuft wie in kernlosen, sog. prokaryontischen Zellen. Verfolgt man die Geschichte zurück, die zu unserem gegenwärtigen Erkenntnisstand geführt hat, stellt man fest, daß die bahnbrechenden Schritte fast ausschließlich an den viel einfacher zu studierenden Prokaryonten gewonnen wurden und in der Folge weitgehend auf Eukaryonten übertragen werden konnten. Dies veranlaßt dazu, für den Prozeß der wenig verstandenen Differenzierung von eukaryontischen Zellen ebenfalls nach prokaryontischen Modellsystemen zu suchen.

An ein solches System muß man Mindestanforderungen stellen: genetisch, morphologisch und funktionell nicht unterscheidbare, sich teilende "omnipotente" Zellen müssen möglichst synchron unter manipulierbaren Bedingungen in mindestens zwei Differenzierungsformen übergehen können; diese dürfen sich in ihrer genetischen Information nicht unterscheiden, sollen aber in Morphologie und Funktion voneinander abweichen.

Ein vergleichsweise einfaches Beispiel kann in der Sporenbildung der prokaryontischen Bacillusarten gesehen werden (1-4). Bei Entzug von Nährstoffen wie Glukose oder Stickstoff hören die Zellen auf, sich in morphologisch und funktionell nicht unterscheidbare "vegetative" Tochterzellen zu teilen. Es folgt eine letzte, asymmetrisch verlaufende Teilung, die zu einer kleineren und einer größeren Hälfte mit gleicher genetischer Information führt. Die kleinere entwickelt sich zur hitzebeständigen "Spore", die größere, als "Mutterzelle" oder "Sporangium" bezeichnet, geht nach erfolgter Sporenbildung zugrunde. Dieses

Geschehen läßt sich in morphologisch definierte "Sporulationsstadien" einteilen. Dabei kann ein Zeitpunkt bestimmt werden, bis zu dem eine Umkehr zu der "vegetativen" Vermehrungsform experimentell möglich ist. Nach dieser Entwicklungsphase, die im angelsächsischen Schrifttum als "commitment" bezeichnet wird, ist jedoch der Weg zur Ausprägung der Sporenform irreversibel programmiert (1,5).

Neben morphologischen lassen sich zahlreiche funktionelle Änderungen beobachten (7). Dies läßt auch einen Unterschied der Proteinzusammensetzung zwischen vegetativen und sporulierenden Zellen erwarten, der mit immunochemischen Methoden tatsächlich nachgewiesen wurde (6). Man hat mit der Sporulation das Auftreten katabolischer Enzymaktivitäten wie Proteasen (8,9), Glucosedehydrogenase (10) und von Enzymen des Zitronensäurezyklus (11-13) korrelieren können. Nur während der Sporulation sind außerdem bestimmte Peptidantibiotika (14), Enzyme der Sporenwandsynthese (15) und spezifische Sporenwandproteine (16) nachzuweisen.

Das Auftauchen neuer Proteine während der Sporulation führt zur Frage nach ihrem Ursprung. Nur ein geringer Teil dürfte durch post-translationelle Veränderungen aus Vorläuferproteinen, die in vegetativen Zellen gebildet wurden, hervorgehen können, wie es z.B. für Aldolase (17) oder ein Antibiotikum von *B.cereus* (18) angenommen werden muß. Der größte Teil der zusätzlichen Proteine entsteht jedoch durch Neusynthese während der Sporulation. Man könnte sich denken, daß auf der Ebene der Translation die Weichen für eine Änderung der Proteinsynthese gestellt werden; so hat man - allerdings nicht unwidersprochen (19) - Änderungen der Stabilität bestimmter m-RNA (20,21), der Ribosomenstruktur (22), der lys-t-RNA (23) oder der Initiationsfaktoren (24) beschrieben. Für den überwiegenden Teil der Veränderungen können solche Regulationsmöglichkeiten jedoch nicht verantwortlich gemacht

werden. Man muß vielmehr schließen, daß die Synthese der meisten spezifischen Sporulations-Proteine erst durch Transkription bisher ruhender genetischer Information ermöglicht wird. Dies zeigt sich einmal daran, daß Transkriptionshemmer die Sporulation verhindern (20), außerdem daran, daß das Basenverhältnis von RNA aus vegetativen und sporulierenden Zellen verschieden ist, was auf eine veränderte RNA-Synthese schließen läßt (25). Besonders aus DNA-RNA-Hybridisierungsexperimenten hat man aufschlußreiche Daten gesammelt, die zu folgenden Schlüssen berechtigen: der größte Teil der RNA aus vegetativen und sporulierenden Zellen ist identisch; ein Anteil der RNA, vorwiegend der m-RNA, wird nur in bestimmten Sporulationsstadien synthetisiert und steht also dem Proteinsyntheseapparat - der selbst unverändert oder verändert sein mag - nur dann zur Verfügung (25-29).

Diese Befunde führen zu der entscheidenden Fragestellung: welches sind die Mechanismen, die die "omnipotenten" Zellen zur Transkription bisher ruhender genetischer Information befähigen, deren Folge letztlich die Ausdifferenzierung der Spore ist?

Spezielle Einführung: das bisherige Modell der Regulation der Sporulation auf der Transkriptionsebene

Bei der Erstellung von Modellen sind oft Vergleiche mit noch einfacheren Systemen hilfreich. Modellvorstellungen, auf die man bei der Erforschung der Sporulation immer wieder zurückgreift, wurden an *E. coli* vor allem für nahrungsbedingte und phageninduzierte Regelmechanismen der Transkription entwickelt. Für An- und Abschaltung von Genen lassen sich dort vor allem zwei Prinzipien finden: einmal Induktion und Repression von Genen über Wechselwirkung von DNA, Proteinfaktoren und niedermolekularen Substanzen (30), zum andern Änderung der Transkriptionsspezifität über strukturelle Veränderungen an der DNA-abh.-RNA-Polymerase (31). Wie sich noch zeigen wird, haben

beide Prinzipien zur Erstellung eines Regulationsmodells für die Sporulation beigetragen.

Als eines der frühesten Ereignisse, die zur Sporenbildung führen, kann man einen Stop der DNA-Synthese beobachten (4). Dies könnte die Frage aufwerfen, ob etwa eine Kopplung zwischen Replikation und Transkription bestimmter Gene angenommen werden muß, wie sie z.B. für die Transkription der sog. "späten" Gene des Bakteriophagen T4 gezeigt wurde (32). Dafür hat man bisher keine zwingenden Hinweise gefunden. Eine Segregation von "vegetativer" DNA in eine "sporen"- und "episomale" DNA, unterscheidbar im GC-Gehalt, die bei *B.cereus* beobachtet wurde (33), könnte man mit Änderungen der Transkription während der Sporulation in Verbindung bringen. Ähnliche Beobachtungen hat man bei andern *Bacillus*-arten jedoch nicht machen können, und nach einer neueren Arbeit über *B.cereus* muß man die früheren Befunde auf andere, die Sporulation begleitende Ereignisse zurückführen, z.B. auf die Induktion eines temperenten Phagen (34). Ferner ist bis jetzt unklar, ob andere Änderungen der DNA, Konformationsänderungen oder chemische Modifikationen, während der Sporulation auftreten und einen Einfluß auf die Transkriptionsspezifität ausüben.

SCHAEFFER et al. haben an *B. subtilis* Beobachtungen gemacht, die sie zur Hypothese veranlaßten, das Ablesen von Sporengenen sei in vegetativen Zellen durch einen intrazellulären, stickstoffhaltigen Kataboliten reprimiert; Erschöpfung des Kulturmediums an rasch metabolisierbarer Kohlenstoff-Stickstoff-Quelle führe zur Erniedrigung der Katabolitenkonzentration und als Folge zu einer Transkription von Sporengenen (35). Diese pleiotrope "Kataboliten-Repression" entspricht dem von JACOB und MONOD beschriebenen Modell der spezifischen Repression eines Genes (30). Natur des Kataboliten, Art und Anzahl der betroffenen, vermutlich katabolische Enzyme kodierenden Gene, sind unbekannt.

LOSICK und Mitarbeitern zufolge ist der entscheidende Schritt, der die Sporenbildung irreversibel bedingt, in einer Strukturänderung der DNA-abh. RNA-Polymerase, auch Transkriptase genannt, zu suchen. Diese Autoren isolierten erstmals die Transkriptase aus vegetativen und sporulierenden Zellen von *B. subtilis*. Während das Enzym aus vegetativen Zellen aus vier verschiedenen Untereinheiten bestand, nämlich aus zwei nicht identischen, großen Untereinheiten sowie aus der kleineren Untereinheit α und dem Initiationsfaktor σ , wies das Enzym aus sporulierenden Zellen nur drei verschiedene Untereinheiten auf, nämlich eine, gegenüber vegetativen Zellen unveränderte große Untereinheit, eine etwas kleinere, die in vegetativen Zellen nicht enthalten war und "veränderte β -Untereinheit" genannt wurde sowie α , nicht aber den Initiationsfaktor σ (36,37). Die aus vegetativen und sporulierenden Zellen isolierten Enzyme zeigten verschiedene Aktivität: nur mit "vegetativem Enzym" konnte die DNA des *B. subtilis*-Phagen ϕ e transkribiert werden, nicht aber mit "Sporulations-Enzym". Dessen Aktivität konnte nur an synthetischem Polyd(AT) bestimmt werden; es war an dieser Matrize sogar aktiver als "vegetatives Enzym" (36,37, 39). "Vegetatives Enzym" war außerdem im Gegensatz zu "Sporulations-Enzym" in der Lage, ribosomale RNA an isolierter *B. subtilis*-DNA zu synthetisieren (41). Diese Beobachtungen ließen sich zusammenfassen zu der Aussage, die DNA-abh. RNA-Polymerase unterliege zu Beginn der Sporulation einer Strukturänderung, die zu einer Änderung der Matrizespezifität des Enzyms führt und dadurch zur Ablesung von Sporengenen (36-41,45). Die Berechtigung, die in vitro erhaltenen Ergebnisse auf Verhältnisse in vivo zu übertragen, schien tatsächlich gegeben: nach LOSICK und SONENSHEIN vermehrt sich der Phage ϕ e nur in vegetativen, nicht aber in sporulierenden Zellen von *B. subtilis*; auch frühe Phagengene werden während der Sporulation nicht abgelesen (36). Nach HUSSEY et al. wird ribosomale RNA nur in vegetativen

Zellen von *B. subtilis* synthetisiert, nicht aber in sporulierenden (40). Außerdem waren Struktur und Aktivität der DNA-abh. RNA-Polymerase aus vegetativen und stationären Zellen von asporogenen *B. subtilis* Mutanten identisch (38, 40, 44).

Als Ursache der beobachteten Modifikation der Transkriptase kommt vor allem eine proteolytische Änderung in Frage, und zwar durch Proteasen, die zu Beginn der Sporulation auftauchen (8,9). Wenn man nun die Hypothesen von SCHAEFFER et al. und von LOSICK und Mitarbeitern kombiniert, scheint ein sehr attraktives Modell für die Regulation der Sporulation gefunden (45): betroffen von der "Kataboliten-Repression" könnte vor allem eine Protease sein; diese, dereprimiert und synthetisiert am Ende des logarithmischen, vegetativen Wachstums, verändert die Transkriptase, indem sie eine der beiden verschiedenen großen Untereinheiten zur "veränderten β -Untereinheit" abbaut. Diese modifizierte RNA-Polymerase, nicht beeinflussbar durch den "vegetativen" Initiationsfaktor σ , der in sporulierenden Zellen außerdem nicht existieren oder in seiner Aktivität inhibiert vorliegen soll, transkribiert frühe Sporengene. Unter den Produkten könnten sich neue Transkriptionsfaktoren, z.B. sporulationsspezifische Initiationsfaktoren befinden, die weitere Veränderungen der Transkriptasespezifität bewirken, so daß "späte" Sporengene transkribiert werden.

Problemstellung

Da man zu Beginn dieser Arbeit allgemein an die Gültigkeit dieses Modells glaubte, lag es nahe, die in vitro-Eigenschaften der verschiedenen Transkriptaseformen näher zu studieren und vor allem nach zusätzlichen Transkriptionsfaktoren zu suchen, etwa nach einem sporulationsspezifischen Initiationsfaktor.

Andererseits bestanden jedoch Bedenken, ob so einschneidende strukturelle Modifikationen der DNA-abh. RNA-Polymerase tatsächlich in vivo stattfinden und kausal mit der Sporulation verknüpft sind oder ob sie nicht erst in vitro während der Enzym-Reinigung stattfinden. Anlaß zu solchen Zweifeln ist vor allem durch eine Arbeit von MILLET et al. gegeben. Diese Autoren behandelten "vegetative" RNA-Polymerase aus *B. subtilis* mit einer Protease aus *B. megaterium*; dabei erhielten sie ein Peptid, das von der sog. "veränderten β -Untereinheit" nicht zu unterscheiden war (46).

Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigt sich deshalb vorwiegend mit Isolierung, Strukturaufklärung und Eigenschaften der DNA-abh. RNA-Polymerasen aus verschiedenen Entwicklungsstadien eines Sporenbildners sowie der Übertragbarkeit der an gereinigten Enzymen gefundenen Ergebnisse auf in-vivo-Verhältnisse.

Wahl des Organismus

Zu solchen Studien sollte sich im Prinzip jede *Bacillus*-art eignen, da nicht zu erwarten ist, daß im Laufe der Evolution unter so nahen Verwandten völlig verschiedene Regulationsmechanismen ausgebildet wurden, um eine gemeinsame Differenzierungsform zu verwirklichen.

Der hier gewählte Sporenbildner *B. cereus* ist für die vorliegende Problematik aus folgenden Gründen besonders gut geeignet:

- die einzelnen Wachstumsphasen können gut synchronisiert (47) und an pH-Änderungen des Mediums verfolgt werden (13); Änderungen in pH-Verlauf, Stoffwechsel und Morphologie sind eindeutig korreliert (13)
- die während der Sporulation auftretenden Proteasen (8) können in vitro vollständig gehemmt werden (48).

Abb. 1 zeigt eine Wachstumskurve von *B.cereus*T mit Einteilung in einzelne Stadien. Der Zeitpunkt " t_0 ", charakterisiert durch Absinken des pH-Wertes im Kulturmedium auf ein Minimum, stellt den Beginn der "reversiblen" frühen Phase der Sporulation dar. Nach Wieder-Anstieg des pH-Wertes auf ein Plateau etwa 2,5 - 3 Stunden nach " t_0 " sind alle Zellen irreversibel zur Sporenbildung bestimmt ("commitment"). Aus Gründen der Synchronisation wurden folgende Erntezeitpunkte gewählt:

- t_{-1} : exponentielle Wachstumsphase, "vegetative" Zellen (eine Stunde vor " t_0 ")
- $t_{1.5}$: Ende des pH-Minimums, Beginn des pH-Anstiegs; alle Zellen damit in reversibler Sporulationsphase (1.5 Stunden nach " t_0 ")
- t_3 : Beginn des pH-Plateaus; alle Zellen damit in irreversibler Sporulationsphase (3 Stunden nach " t_0 ")
- t_5 : spätere Sporulationsphase (5 Stunden nach " t_0 ")
- t_{12} : sehr spätes Sporulationsstadium, Sporen fertig, jedoch noch nicht freigesetzt (12 Stunden nach " t_0 ").

Abb. 1 zeigt außerdem die Korrelation von Proteaseaktivität im Medium und Sporulationsstadien; dabei ist gleichzeitig der Unterschied in der Proteaseproduktion zwischen dem Wildstamm *B.cereus*T und der proteasearmen Mutante *B.cereus*TC zu erkennen.

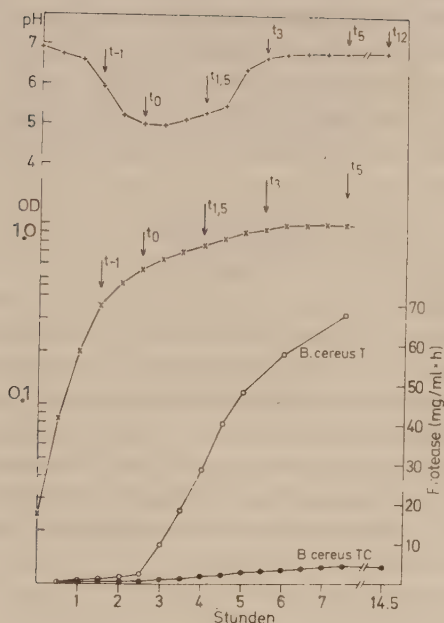


Abb. 1: Wachstumskurve, pH-Verlauf und Proteaseaktivität im Kulturmedium

B. cereus T wurde in Medium G (1 l) gezüchtet. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, die Zelldichte als Trübung bei 440 nm (x—x) gemessen sowie der pH-Wert des Mediums bestimmt (+—+). Ein weiteres Aliquot wurde zur Entfernung der Bakterien zentrifugiert, der Überstand wurde auf Proteaseaktivität an Azocasein untersucht (o—o) (Meth.). In gleicher Weise wurde die Proteaseaktivität der Mutante *B. cereus* TC ermittelt (●—●).

RESULTATE

1. Isolierung der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.cereusT

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Reinigung der DNA-abh.RNA-Polymerase aus Prokaryonten beschrieben (49-54). Wie im Folgenden gezeigt wird, mußte eine für E.coli beschriebene Methode (52), hier als "PolyminP-Methode" bezeichnet, verändert werden, lieferte dann jedoch aus vegetativen und sporulierenden Zellen Enzympräparationen von hoher Reinheit, Aktivität und Stabilität.

1.1. Isolierung aus vegetativen Zellen

1.1.1. Puffer, Zellaufschluß

Üblicher TMA-Puffer (52) und Methodenteil) konnte erst nach Komplettierung mit 10 % (v/v) Glycerin als Isolierungs-Puffer verwendet werden; ohne Glycerin wurde ein rascher Aktivitätsverlust beobachtet. Der Zellaufschluß wurde mit Glasperlen in einer Zelmühle (55) bei etwa 5000 upm portionsweise durchgeführt. Nach 3-5 min. Behandlung waren nach lichtmikroskopischer Kontrolle über 98 % der Bakterien geöffnet, die RNA-Polymerase damit der Reinigung zugänglich.

1.1.2. PolyminP-Schritte

Nach Entfernen der Glasperlen ergab der Zusatz von PolyminP eine erste Reinigung: während die RNA-Polymerase zusammen mit einem Großteil der Proteine und Nukleinsäuren wie bei E.coli vollständig präzipitiert wurde (52), ließen sich viele andere Proteine und niedermolekulare Zellsaftkomponenten durch Zentrifugation bei relativ geringen Drehzahlen (s.Meth.) als Überstand abtrennen. Eine PolyminP-Menge (5%-Lösung in TMAG) von 1 ml/g Bakterien war ausreichend für vollständige Fällung.

Die Hauptmasse der Begleitproteine konnte durch Waschen mit 0.6 M NH_4Cl in TMAG-Puffer aus dem Sediment entfernt werden, so daß die RNA-Polymerase nach anschließender Elution mit 0.9 M NH_4Cl in TMAG-Puffer stark angereichert vorlag.

(16-fach, Kap. 1.3., Tab. 1). Nur wenig Enzym (bis zu 20%) wurde bei Nachelution des verbleibenden PolyminP-Sediments mit 1.2 M NH_4Cl in TMAG-Puffer gefunden. Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung ließ sich zwar keine weitere Anreicherung erreichen, jedoch war dieser Schritt geeignet, um die notwendige Konzentrierung der RNA-Polymerase aus der stark salzhaltigen Lösung durchzuführen. Bei den breit gewählten Fällungsgrenzen von 45-70 % Sättigung an Ammoniumsulfat fiel das Enzym vollständig aus ("Fraktion I").

1.1.3. Dichtegradienten-Zentrifugation

Fraktion I konnte durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten weiter gereinigt werden. Als günstig erwies sich hierfür ein linearer Gradient von 10-30 % Rohrzucker und 5-10 % Glycerin in TMA-Puffer mit 0.5 M NH_4Cl . Für kleine Mengen Bakterien (40-60 g) war Zentrifugation in einem Ausschwingrotor (SW 27, Beckmann), für größere Mengen (z.B. 200 g) in einem Zonenrotor geeignet (B14, Beckmann). Wie Abb. 2 zeigt, findet man unter solchen Bedingungen die Hauptmasse der Proteine in der oberen, leichten Hälfte des Gradienten, die RNA-Polymerase-Aktivität im absteigenden Teil des zweiten Proteingipfels. Die Analyse der Fraktionen mit RNA-Polymerase-Aktivität auf einem Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS zeigte nur wenige Peptidbanden (Abb. 3), darunter auch die vier typischen (siehe später, Abb. 6). Wie aus Abb. 3 ebenfalls hervorgeht, enthielten die Gradienten-Fraktionen mit RNA-Polymerase-Aktivität unterschiedliche Mengen an σ -Peptid; die "leichte" Seite des Enzymgipfels glich dabei eher "Minimalenzym", während die RNA-Polymerase in den Fraktionen der "schweren" Seite nahezu stöchiometrische Mengen an Peptid σ enthielt.

Von Präparation zu Präparation unterschiedliche Mengen σ -Aktivität (siehe Kap. 4) fanden sich bei der hier gewählten hohen Ionenstärke (52) auch im Proteinhauptgipfel. Dies traf besonders zu bei dem sonst nicht benutzten Stamm B.cereusTR, einer gegen den Phagen ØCL resistenten Mutante des Wildtyps B.cereusT.

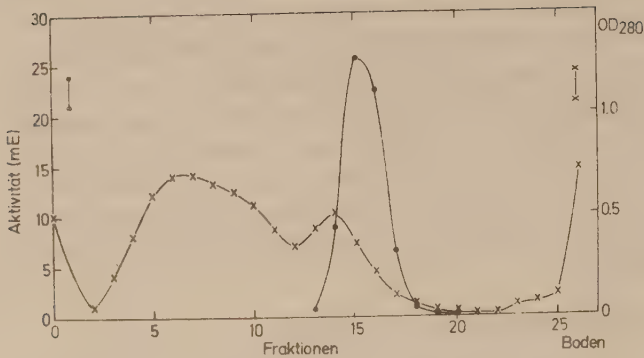


Abb. 2: Trennung der RNA-Polymerase aus vegetativen Zellen durch Rohrzucker-Dichtegradienten-Zentrifugation

Fraktion I aus 200 g Zellen wurde in 30 ml TMAG-Puffer gelöst, auf einen 650 ml-Gradienten von 10–30 % Rohrzucker in TMAG-Puffer + 0.5 M NH_4Cl geschichtet und für 38 Std. bei 45 000 upm in einem Zonalrotor B 14 zentrifugiert. Fraktionen à 25 ml wurden gesammelt. 50 μl Proben wurden auf RNA-Polymerase-Aktivität im Standardansatz an $\phi\text{CL-DNA}$ (●—●) getestet. Proteinkonzentration ist als Absorption bei 280 nm angegeben (x—x).

Eine Ursache für das teilweise Abdissoziieren von Faktor σ , – auch bei anderen Organismen beobachtet (56,57) – ist sicher in der hohen Ionenstärke des Gradienten zu suchen, da in Gradienten niedriger Ionenstärke (ohne 0.5 M NH_4Cl) dieser Effekt schwächer war (Analyse auf Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von SDS). Die Reinigung über "Niedersalzgradienten" zeigte jedoch in dieser Stufe zwei schwerwiegende Nachteile, die eine Anwendung der bei *E.coli* gut geeigneten Methode (52) praktisch ausschlossen: der Reinigungseffekt war erstens geringer als beim "Hochsalz-Gradienten", und zweitens wurde ein erheblicher Aktivitätsverlust beobachtet.

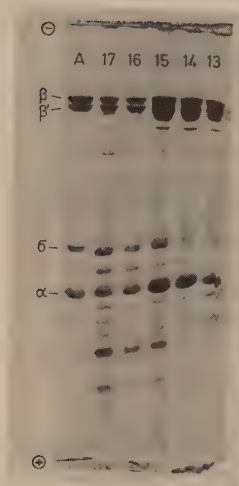


Abb. 3: SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der RNA-Polymerase nach Reinigung über Rohrzucker-Gradienten-Zentrifugation

Zahlen entsprechen den Fraktionen der Abb. 2.5-8 μg jeder Fraktion wurde über ein Plattengel (10 % Polyacrylamid) getrennt (s.Meth.). A: über DNA-Agarose gereinigtes Enzym.

Die spezifische Aktivität der RNA-Polymerase nach Reinigung über einen "Hochsalz-Gradienten" war gegenüber "Fraktion I" um einen Faktor 5-10 erhöht. Nach erneuter Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung ließ sich das Enzym, in TMA-Puffer mit 50 % Glycerin aufgenommen, ohne nennenswerten Aktivitätsverlust über Monate bei -20°C lagern.

Als eine gegenüber Störungen besonders unanfällige Methode zur Verfolgung der Enzymanreicherung erwies sich die Trennung der Peptide auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS. Diese Technik war möglich wegen einer besonderen Eigenschaft des Enzyms: nur wenige Peptide haben eine vergleichbare Größe wie seine beiden großen Untereinheiten (s.u.), so daß diese selbst in sehr wenig gereinigten Fraktionen ("R30-Überstand") gut zu identifizieren sind.

1.2. Isolierung aus sporulierenden Zellen

1.2.1. Zellaufschluß, Puffer

Zur vollständigen Lyse im portionsweisen Aufschluß mit Glasperlen waren für sporulierende Zellen 5-7 Minuten (t_{0-3}), 7-10 Minuten (t_{3-5}) oder gar 15-20 Minuten (t_{12}) erforderlich. Bei solchen Bedingungen konnte nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der Enzym-Moleküle - z.B. die in den ersten Min. der Behandlung freigesetzten Moleküle - während der Fortdauer der Einwirkung der starken mechanischen Kräfte denaturiert wurden. Starke Schwankungen der Gesamtaktivität bei methodisch identischen Isolierungen aus gleichem Ausgangsmaterial wie auch Ergebnisse aus schrittweiser Lyse für analytische Zwecke legen diese Interpretation nahe.

Wie sich herausstellte, war mechanische Inaktivierung nicht der Grund, warum die oben beschriebene Methode nicht unverändert auf sporulierende Zellen angewendet werden konnte. Sie führte in diesem Fall zu einem Enzym, das an Polyd(AT) aktiver war als an Phagen-DNA (ØCL-DNA). Die Analyse dieses Enzyms legte den Verdacht auf proteolytische Veränderungen während der Reinigung nahe, da, von Präparation zu Präparation wechselnd, verschiedene, nicht stöchiometrische Mengenverhältnisse zwischen den beiden großen Untereinheiten und einem etwas kleineren, zusätzlichen Peptid gefunden wurden (siehe hierzu auch weitere Untersuchungen in Kapitel 6).

Basierend auf der Hemmbarkeit der B.cereus Proteasen (48), ließ sich jedoch eine Methode ausarbeiten, die auch aus sporulierenden Zellen aktives (an ØCL-DNA) Enzym lieferte.

Zweimaliges Waschen der geernteten Zellen mit einem Puffer sehr hoher Ionenstärke zur Entfernung der extrazellulären Proteasen, Verzicht auf Magnesiumionen, sowie Erhöhung der EDTA-Konzentration und Gegenwart von PMSF im Isolierpuffer (TEAG, s. Meth.) zur Hemmung von intrazellulären Proteasen, ergab Enzymfraktionen, die in keiner Reinigungsstufe Proteaseaktivität an Azocasein als Testsubstrat zeigten. Schritte, in denen Enzym in Lösung vorgelegen hätte, wurden außerdem auf ein absolutes Minimum reduziert (insbesondere keine Dialyse, keine Dichtegradienten-Zentrifugation). Als besonders geeigneter Schritt hat sich dagegen Chromatographie an Trägergebundener DNA (58,59) erwiesen.

1.2.2. Grobanreicherung über PolyminP-Fällung

Trotz Änderung der Pufferzusammensetzung verlief die Reinigung in den ersten Schritten genauso wie für vegetative Zellen beschrieben. Zu 70-80 % war die RNA-Polymerase in der Fraktion enthalten, die zwischen 0.6-0.9 M NH_4Cl in TEAG-Puffer vom "PolyminP-Sediment" (s.o.) eluiert wurde. Identisch gewählt werden konnten auch die Fällungsgrenzen der Ammoniumsulfat-Konzentrierung (45-70 %). Die Aktivitäten der resultierenden "Fraktionen I" sind für verschiedene Zellstadien in Tab. 1 einander gegenübergestellt. Die einzelnen Ausbeuten sind auf dieser Stufe gut miteinander vergleichbar. "Fraktion I", in TEMEG-Puffer (Meth.) aufgenommen, konnte ohne Aktivitätsverlust über Wochen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Als Anmerkung sei betont, daß sich Zellmengen von 40-60 g aus technischen, vor allem zeitlichen Gründen am besten für eine Reinigung der RNA-Polymerase aus sporulierenden Zellen eigneten. Größere Mengen (z.B. 200 g) verlängerten die für die einzelnen Schritte benötigten Zeiten. Dies führte im Vergleich zu kleineren Mengen jeweils zu beträchtlichen Aktivitätsverlusten.

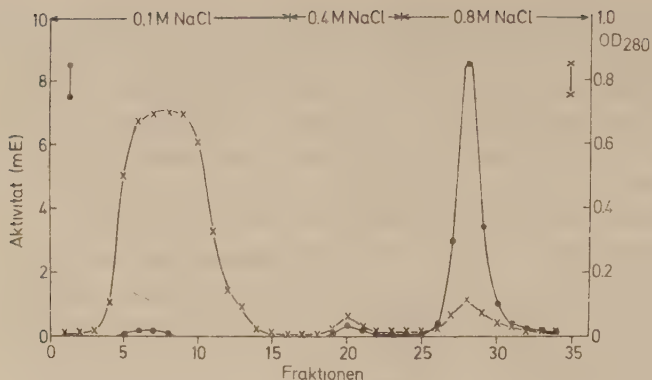


Abb. 4: Affinitätschromatographie der RNA-Polymerase

Fraktion I aus 40 g Zellen wurde in 25 ml TEMEG-Puffer + 0.1 M NaCl gelöst und auf eine ØCL-DNA-Agarose-Säule (1.5 x 10 cm) aufgepumpt (Fließgeschwindigkeit 6-8 ml/Std.). Mit gleichem Puffer wurde gewaschen, bis die OD₂₈₀ (x—x) ihren Ausgangswert erreichte. Eluiert wurde mit TEMEG-Puffer + 0.4 bzw. 0.8 M NaCl. Fraktionen a 5 ml wurden gesammelt. 25 µl jeder Fraktion wurden im Standardansatz mit ØCL-DNA auf RNA-Polymeraseaktivität getestet (●—●).

1.2.3. Affinitätschromatographie an DNA

Von ALBERTS et al. (58) bzw. SCHALLER et al. (57) wurden Verfahren beschrieben, RNA-Polymerase aus E. coli an Trägergebundener Doppelstrang (58)- bzw. Einzelstrang (59)-DNA zu reinigen, basierend auf der Affinität dieses Enzyms zu DNA.

Hochgereinigte RNA-Polymerase aus B.cereusT-Zellen ließ sich nach beiden Methoden direkt aus "Fraktion I" gewinnen. Dazu wurde "Fraktion I" ohne vorherige Dialyse, jedoch nach genügender Verdünnung mit TEMEG-Puffer auf die entsprechenden Säulen aufgetragen. Abb. 4 zeigt eine typische Auftrennung aus sporulierenden Zellen (t₃) an

Einzelstrang-DNA-Agarose; im Anhang ist eine entsprechende an Doppelstrang-DNA-Cellulose gezeigt am Beispiel *B. stearothermophilus* NU 10, identisch durchgeführt mit vergleichbarem Ergebnis wie bei *B. cereus* T (Abb. 29).



Abb. 5: SDS-Polyacrylamid(10 %)-Gel-Elektrophorese der RNA-Polymerase-Fractionen nach Trennung auf ϕ CL-DNA-Agarose

(A) Proteingipfel "0.4 M NaCl"
(B) Proteingipfel "0.8 M NaCl"

1.2.3.1. Reinigung an ϕ CL-DNA-Agarose

Die DNA des *B. cereus* T-Phagen ϕ CL (Anhang) wurde nach SCHALLER et al. (59) an Agarose gebunden. Die meisten Proteine wurden bei einer Salzkonzentration von 0.1 M NaCl in TEMEG-Puffer auf der ϕ CL-DNA-Agarose-Säule nicht zurückgehalten, wohl aber wenige, vorzugsweise kleine Peptide ($M_r < 30\,000$) und vor allem die RNA-Polymerase (Abb. 5). Die Begleitproteine eluierten bei niederen

(0.25-0.4 M NaCl), die RNA-Polymerase erst bei höheren Salzkonzentrationen. Die Reinigung konnte über einen linear ansteigenden Gradienten von NaCl in TEMEG-Puffer durchgeführt werden, jedoch einfacher und schneller, mit gleichem Erfolg über zwei Stufenschritte. (TEMEG-Puffer + 0.4 M NaCl für die Entfernung der Begleitproteine, TEMEG-Puffer + 0.8 M NaCl für die Elution der RNA-Polymerase (Abb. 4)). Die auf diese Weise gewonnene RNA-Polymerase war von hoher Reinheit (Abb. 5,6) und enthielt stöchiometrische Mengen an Faktor σ (s.u.). Weitere Methoden - z.B. Zentrifugation über Rohrzucker-Dichtegradienten (s.o.) - führten nicht zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität.

Im Gegensatz hierzu war die Reinheit nach DNA-Cellulose-Chromatographie geringer, so daß ein weiterer Reinigungsschritt nötig war. Die Ausbeute war andererseits höher als an DNA-Agarose, was zur nachfolgenden Darstellung von Minimal-Enzym (s.u.) von Vorteil war.

Gereinigte Enzyme aus sporulierenden Zellen waren nach Konzentrierung über Ammoniumsulfat gleich stabil wie solche aus vegetativen Zellen.

Tab. 1: Reinigung der RNA-Polymerasen aus verschiedenen Stadien von *B. cereus*T

RNA-Polymerasen aus 40 g Zellen der indizierten Stadien wurden wie unter Methoden beschrieben gereinigt. Die Aktivität der aufgeschlossenen Zellen (= Homogenat) wurde im 30 000 x g Zentrifugationsüberstand gemessen. Ausbeuten und Reinigungsfaktoren beziehen sich auf die Homogenatwerte.

Stadium	Fraktion	Ges. Protein		Ges. Akt.	Aus- beute	Spez. Akt.	Reinigung
		mg	mE	%	mE/mg	-fach	
Vegetativ	Homogenat	1630	1800	100	1.1	1	
	Fraktion I	53	935	52	17.6	16	
	DNA-Chromatographie-Gipfel	2.7	342	19	127	115	
Sporulation (1.5 h)	Homogenat	1540	1320	100	0.86	1	
	Fraktion I	44	540	41	12.2	14	
	DNA-Chromatographie-Gipfel	1.7	214	16	125	145	
Sporulation (3 h)	Homogenat	1350	1630	100	1.2	1	
	Fraktion I	37	895	55	24	20	
	DNA-Chromatographie-Gipfel	2.7	415	26	152	127	
Sporulation (12 h)	Homogenat	1220	856	100	0.7	1	
	Fraktion I	31	395	46	12.7	18	
	DNA-Chromatographie-Gipfel	1.3	188	22	141	201	

1.3. Vergleich der Isolierung aus vegetativen und sporulierenden Zellen

Zum Vergleich wurde RNA-Polymerase aus vegetativen Zellen ebenfalls über DNA-Affinitätschromatographie gereinigt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu sporulierenden Zellen gefunden werden (abgesehen von spezifischen Begleitproteinen, siehe hierzu Kap. 5 und Abb. 8). In Tab. 1 wurden die Daten für vier typische Präparationen zusammengefaßt. Ausbeuten, spezifische Aktivitäten und Reinigungsfaktoren unterschieden sich nur unwesentlich, wohl aber die Gesamtaktivität, bezogen auf Gramm Ausgangsmaterial. Diese betrug im angegebenen Fall bei t_{12} - nur 47 % gegenüber t_{-1} - Zellen, in anderen Fällen noch weniger.

Die Frage taucht auf, ob während der Isolierung (relativ kleine Ausbeuten) oder gerade durch die Art der Isolierung nur eine bestimmte Form der RNA-Polymerase aus sporulierenden Zellen angereichert, eine andere Form jedoch verloren wurde. Nach den detaillierten Untersuchungen in Kap. 5 und 6 ist dies jedoch nicht der Fall.

2. Die Struktur der DNA-abh. RNA-Polymerase aus B.cereusT

2.1. Zusammensetzung aus Untereinheiten

Die spezifische Aktivität von über DNA -Agarose gereinigtem Enzym konnte durch weitere Trennverfahren nicht erhöht werden. Nach Zentrifugation über einen Rohrzucker-Dichtegradienten enthielt der einzige Proteingipfel die gesamte Enzymaktivität. Während elektrophoretische Trennung in einem harnstofffreien Puffersystem ebenfalls nur zu einer einzigen Proteinbande führte, ergab die entsprechende Trennung in einem reduzierenden, harnstoffhaltigem Puffersystem nach HEIL u. ZILLIG (60) (Meth.) die drei Proteinbanden I, II und III (Abb. 6). In einem Elektrophoresesystem nach LÄMMLI (121) - diskontinuierliches Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS - spaltete das Enzym in vier Peptide auf, hier als die Untereinheiten der RNA-Polymerase aus B.cereusT

bezeichnet. Sie wurden der Größe nach β, β', σ und α genannt. Bande I der Cellogelelektrophorese entspricht β' , Bande II β und Bande III ist aus α und σ zusammengesetzt.



Abb. 6: Cellogel-Elektrophorese der RNA-Polymerase aus vegetativen und sporulierenden Zellen und nachfolgende Trennung auf SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

- Je 40 μg gereinigte RNA-Polymerase aus vegetativen (V) und sporulierenden Zellen (S) wurde auf Celluloseacetat-Streifen getrennt (Meth.).
- Die gefärbten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach BOYD et al. (64) getrennt.

Eine spezielle Anmerkung zur Benennung der beiden großen Untereinheiten scheint angebracht. Die Trennung der Untereinheiten nach Ladungsdichte zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden großen Untereinheiten (Bd. I und II in Abb. 6a). Ohne eine Aussage über die weitgehend unbekannte Funktion dieser Peptide vorwegnehmen zu wollen, scheint es sinnvoller, sie nicht ihrer Größe, sondern ihrer

Basizität nach in Analogie zu den Untereinheiten der RNA-Polymerase aus *E.coli* (60) zu benennen. Nach diesem Kriterium ist die kleinere, basischere der beiden großen Untereinheiten als β' zu bezeichnen, im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *E.coli* (60). Ähnliche Verhältnisse liegen bei *B.stearothermophilus* vor. ZECHEL konnte dort zeigen, daß - wie bei *E. coli* (62) - nur die basischste Untereinheit des Enzyms den RNA-Polymerase-Inhibitor Heparin bindet (61).

2.2. Stöchiometrie, Molekulargewichte

Die Molekulargewichte von Peptiden lassen sich durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von SDS bestimmen (63). Eine entsprechende Analyse wurde auf einem Plattengel (64) durchgeführt mit den Eichpeptiden Lysozym (14 000 Daltons), Trypsin (23 000 Daltons) (65) und den Untereinheiten der RNA-Polymerase aus *E.coli* ($\beta' = 160\ 000$, $\beta = 155\ 000$, $\sigma = 92\ 000$ und $\alpha = 40\ 000$ Daltons, nach 66). Hieraus resultierten Molekulargewichte von 140 000, 130 000, 56 000 und 43 000 für β, β', σ bzw. α (Abb. 7). Die quantitative Zusammensetzung aus den Untereinheiten läßt sich abschätzen, wenn man die getrennten Peptide nach der Färbung densitometrisch auswertet. Unter der Annahme, daß das Proteinfärbereagens "Coomassie-Blau" die Peptide pro Masseneinheit gleich stark angefärbt hat, wie dies für *E.coli*-RNA-Polymerase annähernd gilt (134), ergab sich ein Verhältnis von $\beta' : \beta : \sigma : \alpha$ wie 1 : 1 : (0.7-1.0) : 2. Daraus folgt die Bruttoformel $(\beta'\beta\alpha_2)\sigma$ in Analogie zum entsprechenden Enzym aus *E.coli* (54); das Summengewicht des Enzyms beträgt hiernach 412 000.

2.3. Die Struktur der RNA-Polymerase im Laufe der Sporulation

LOSICK und Mitarbeiter (37) haben bei *B.subtilis* eine Strukturänderung des Enzyms im Laufe der Sporulation beschrieben. Diese wurde hier bei *B.cereus*T nicht gefunden. Isolierte Enzyme aus allen Wachstumsphasen zeigten nach Auftrennung über Polyacrylamidgele in Gegenwart von SDS die vier beschriebenen Untereinheiten (Abb. 8). Auch in der quantitativen Zusammensetzung war eine Veränderung nicht zu beobachten.

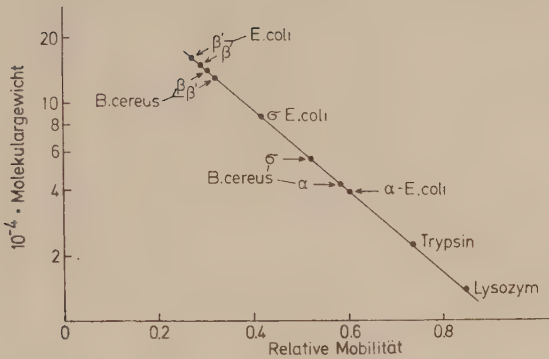


Abb. 7: Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten der RNA-Polymerase aus *B. cereus*T

*B. cereus*T RNA-Polymerase und Referenzpeptide wurden über SDS-Gel-Elektrophorese (5-25 % Polyacrylamid, log. Gradient, s. Meth.) getrennt.

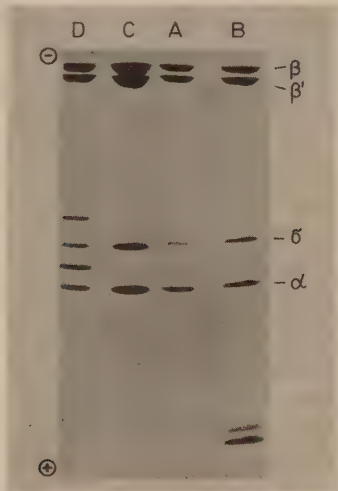


Abb. 8: SDS-Polyacrylamid (5-25 %)-Gel-Elektrophorese von RNA-Polymerasen aus verschiedenen Sporulationsstadien von *B. cereus*T

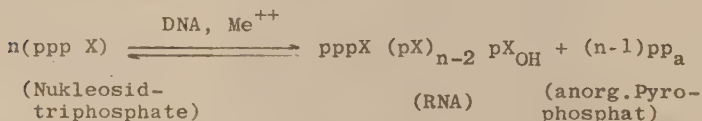
- (A) RNA-Polymerase (3 μg) aus vegetativen Zellen
 (B-D) RNA-Polymerase aus sporulierenden Zellen
 (B: 5 μg aus $t_{1.5}$ -Zellen, C: 7 μg aus t_3 -Zellen, D: 5 μg aus t_{12} -Zellen).

Zusätzliche Peptide wurden aus den einzelnen Stadien mit-isoliert. Ihre stöchiometrischen Beziehungen zur RNA-Polymerase - besonders deren Wechsel im Laufe der einzelnen Reinigungsschritte - gaben keinen Anlaß, sie für zusätzliche Untereinheiten zu halten (siehe auch Kapt. 5).

Die obige Analyse erfaßt nicht Änderungen, die zwar kaum die Größe der Peptide, wohl aber deren Ladungsdichte betrifft. So kann in einem SDS-Polyacrylamid-Trennsystem die "normale" E.coli- α -Untereinheit nicht von der durch T4-Infektion "modifizierten" E.coli- α -Untereinheit unterschieden werden, während dies in der nach Ladungsdichte trennenden Cellogelelektrophorese ohne weiteres möglich ist (67). Wie Abb. 6a zeigt, führte auch ein solches Trennsystem nicht zu einer Unterscheidung zwischen Untereinheiten aus verschiedenen Wachstumsstadien.

3. Die enzymatische Aktivität der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.cereusT

Die für DNA-abh.RNA-Polymerasen (E.C. 2.7.7.6.) typische Reaktion



läßt sich durch Einbau von Radioaktivität in säureunlösliches Reaktionsprodukt aus einer säurelöslichen Vorstufe verfolgen. Im Folgenden wird gezeigt, daß das hier beschriebene Enzym die Reaktionsbedingungen erfüllt. Ein von FUCHS (68) beschriebenes Testsystem für E.coli-Enzym mußte für optimale Bedingungen nur wenig variiert werden.

3.1. Abhängigkeit von DNA, Nukleosidtriphosphaten und Salzen

Die enzymatische Aktivität war strikt abhängig von der Gegenwart einer DNA im Testansatz. Von den eingesetzten Prägnern - jeweils im DNA-Sättigungsbereich - war die DNA des *B.cereus*T-Phagen ØCL am wirksamsten, etwas weniger aktiv waren die DNAs der Phagen Øμ4, T5 und T7, erheblich schlechter T4-Phagen-, *B.cereus*T-, Kalbsthymus-DNA oder synthetisches Polyd(AT) (Tab. 2). In allen getesteten Fällen war native DNA geeigneter als hitze-denaturierte ("Einzel-Strang") DNA (Beispiel ØCL, Tab. 2). Vorbehandlung der DNAs mit DNase führte zum Verlust der Aktivität, desgleichen das Weglassen der Matrize (Tab. 3). Ohne die 4 Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP und CTP findet keine enzymatische Reaktion statt. Abwesenheit auch eines Nukleotids führte zum fast vollständigen Erliegen der Synthese. (Tab. 3).

Durch die Anwesenheit eines Triphosphat-regenerierenden Systems (s.Meth.) in allen Testansätzen wurde gewährleistet, daß keine Nukleosid-Diphosphate angehäuft wurden. Diese könnten durch Fremdaktivitäten in wenig gereinigten RNA-Polymerase-Präparationen gebildet werden. Nukleosid-Diphosphate sind andererseits Substrate von Polynukleotid-Phosphorylasen. In Rohextrakten würde dadurch die Aktivitätsbestimmung der RNA-Polymerase verfälscht (69).

Anwesenheit von Mg^{++} -bzw. Mn^{++} -Ionen ist ebenfalls unerläßlich (Tab. 3 und Abb. 9). Wie bei den meisten beschriebenen RNA-Polymerasen aus Prokaryonten - außer *L.curvatus* (70) - war die Aktivität bei optimaler Mg^{++} - (30-60 mM) höher als bei optimaler Mn^{++} -Konzentration (5 mM), wenn Phagen-DNA als Präger vorgelegt wurde (Faktor 5 an ØCL-DNA, Abb. 9). Nur im Fall von Polyd(AT) war die Mn^{++} -katalysierte Nettosynthese höher (Faktor 2-3).

Tab. 2: Aktivitätsverhältnis verschiedener DNAs im Standardansatz

Standardansätze mit je 1 µg RNA-Polymerase; unter DNA-Sättigungsbedingungen getestet. Die säureunlösliche Radioaktivität wurde wie im Methodenteil bestimmt.

* 0.2 M KCl, ** 0.1 M KCl im Ansatz

DNA	Aktivität (pMol)	% ØCL- Aktivität
ØCL, ds*	1520	100
ØCL, ss	128	8.4
Øµ4 **	660	43.5
T4	143	9.4
T5*	813	53.5
T7	683	45.0
B. cereus T	160	10.5
Kalbsthymus	164	10.8
Polyd(AT)	310	20.4

Tab. 3: Abhängigkeit der RNA-Polymeraseaktivität von der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Der komplette Ansatz enthielt: 0.8 µg RNA-Polymerase, 10 µg ØCL-DNA, 20 mM MgCl₂, 0.2 M KCl, je 1 mM ATP (14-C-ATP, 1 Ci/M), GTP, UTP und CTP, 30 mM Tris-Cl pH 8.2. Die Synthese (10 Minuten bei 37° C) wurde jeweils durch Zugabe von ATP gestartet. Hemmstoffe je 80 µg/ml außer Rifampicin (5µg/ml). Aktivität ist als pMol-14C-AMP-Einbau in säureunlösliches Material angegeben.

Ansatz	Aktivität (pMol)	% komplettes System
Komplett	1167	100
-Enzym	20	1.7
-DNA	25	2.1
-Mg ⁺⁺	22	1.9
-Mg ⁺⁺ , + Mn ⁺⁺	215	18.5
-KCl	725	62.2
-GTP	43	3.7
-UTP	67	5.7
-CTP	34	2.9
+Actinomycin	22	1.9
+Proflavin	20	1.7
+Heparin	23	2.0
+Rifampicin	22	1.9

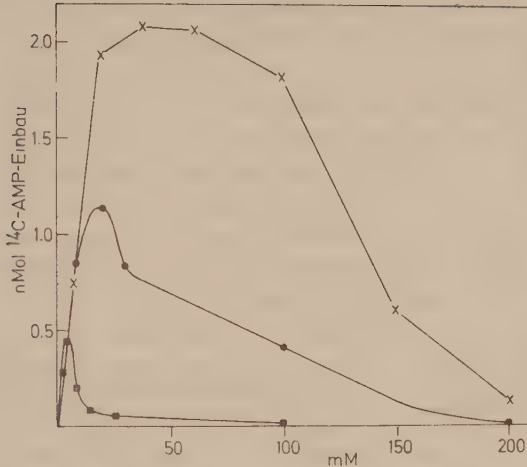


Abb. 9: Abhängigkeit der RNA-Polymerase-Aktivität von der Mg⁺⁺- bzw. Mn⁺⁺-Ionen-Konzentration im Standard-test

Je 2 µg RNA-Polymerase aus *B. cereus* T wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Magnesiumacetat bzw. Manganchlorid für 10 Minuten bei 37° C im Standardansatz inkubiert und die säureunlösliche Radioaktivität wie beschrieben bestimmt (Meth.) (x—x): ØCL-DNA, Mg⁺⁺-Ionen, (■—■): ØCL-DNA, Mn⁺⁺-Ionen, (●—●): T7-DNA, Mg⁺⁺-Ionen.

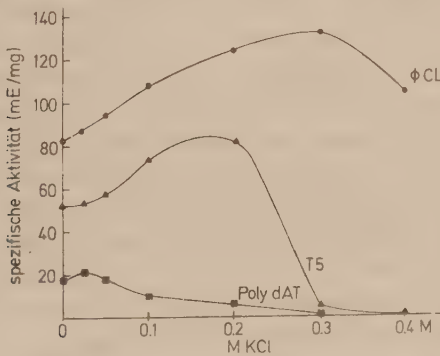


Abb. 10: Einfluß der KCl-Konzentration auf die Transkription an verschiedenen Matrizen durch *B. cereus*-T RNA-Polymerase

Gereinigte RNA-Polymerase (2 µg) wurde im Standardtest in Gegenwart verschiedener Mengen KCl an 12 µg ØCL-DNA (●—●), 12 µg T5-DNA (▲—▲) oder 5 µg Polyd(AT) (■—■) getestet.

Die Wirkung der Mg^{++} -Ionen ist teilweise durch monovalente Kationen zu ersetzen (Ionenstärkeeﬀekt). So konnte die suboptimale Aktivität an ϕ CL-DNA bei 20 mM Mg^{++} (Abb. 9) auch durch Zugabe von K^{+} -Ionen gesteigert werden (Abb. 10). Na^{+} - und NH_4^{+} -Ionen hatten denselben Einfluß (nicht gezeigt). Die optimale Ionenstärke (Abb. 10) der enzymatischen Reaktion hing weniger von dem Enzym ab, als von der eingesetzten DNA. Wie in Abb. 10 gezeigt ist und auch aus den Tab. 5 und 6 (Kap. 3.4) hervorgeht, lag dieses Optimum bei hohen Werten (0.2-0.3 M KCl), wenn ϕ CL-DNA verwendet wurde, etwas niedriger bei T5-DNA (0.2 M KCl) und bei allen übrigen DNAs bei 0.1 M KCl bzw. noch darunter (Polyd(AT)). Vergleichende Arbeiten in unserer Gruppe haben gezeigt, daß dies keine Besonderheit des hier verwendeten Enzyms aus *B.cereus* T ist, sondern auch bei denjenigen aus *E.coli* (114), *L.curvatus* (70) und *B.stearothermophilus* (Anhang) an denselben DNAs entsprechende Salzoptima zu beobachten sind. Da im Laufe der hier durchgeführten Arbeit jeweils mehrere DNAs als Präger eingesetzt wurden, empfahl sich für den Standardansatz eine Mg^{++} -Konzentration von 20 mM; die Ionenstärke wurde gegebenenfalls mit KCl erhöht.

3.2 . Abhängigkeit von pH, Temperatur und Zeit

Das pH-Optimum der enzymatischen Reaktion ist relativ breit und liegt bei pH 8.2-8.3 (Abb. 11). Der Kurvenverlauf kann mit der entsprechenden Kurve des verwandten *B.stearothermophilus*-Enzyms verglichen werden (71). *E.coli*-Enzym hat ein etwas niedrigeres pH-Optimum (68). Die optimale Synthesetemperatur liegt zwischen 32-37° C (Abb. 12) und damit etwas über der optimalen Wachstumstemperatur des Organismus in vivo (30-34° C, (72)). Unter den "Standardbedingungen" war die Nettosynthese linear von der Inkubationszeit abhängig (Abb. 13). In Abb. 10 wurde bereits die Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenstärke gezeigt; dieser Effekt war größer, wenn für längere Zeiten als 10 Min. inkubiert wurde (Abb. 13). Bei hoher Ionenstärke war die Synthese längere Zeit linear (siehe hierzu auch Anhang!).

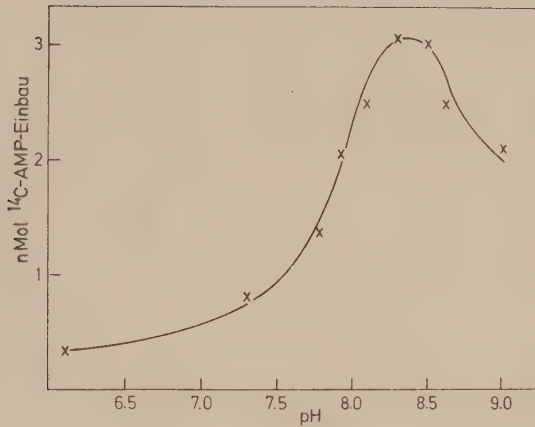


Abb. 11: Abhängigkeit der RNA-Synthese vom pH-Wert im Standardansatz

In doppelten Ansätzen (12 $\mu\text{g/ml}$ RNA-Polymerase, 40 $\mu\text{g/ml}$ ϕCL -DNA, Salze und Nukleosidtriphosphate wie im Standardansatz) wurde der pH-Wert verschiedener Tris-Acetat-Zusammensetzungen (0.03 M) gemessen und davon je 250 μl für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Radioaktivität wie in Meth. bestimmt.

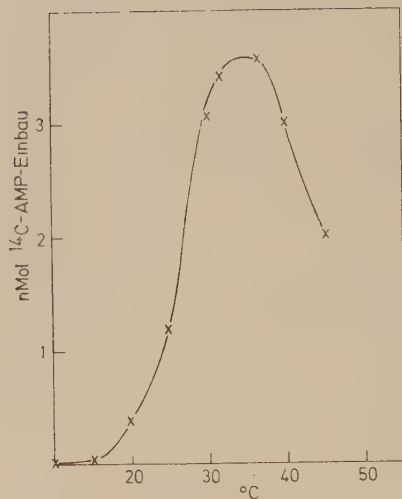


Abb. 12: Abhängigkeit der RNA-Synthese von der Inkubations-
temperatur

Je $2.5\ \mu\text{g}$ RNA-Polymerase wurden im Standardansatz ($40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ $\phi\text{CL-DNA}$, $0.2\ \text{M KCl}$) für 10 Minuten bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt.

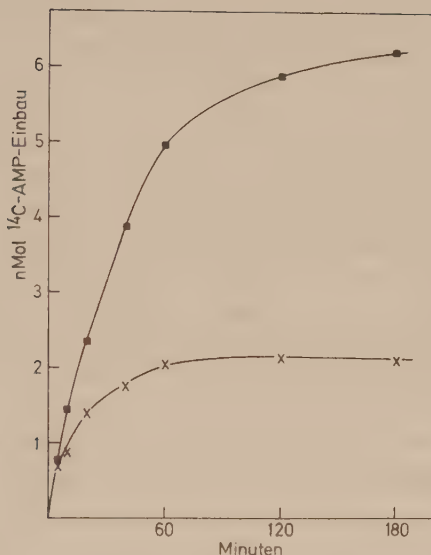


Abb. 13: Abhängigkeit der RNA-Synthese von der Inkubationszeit bei verschiedener Salzkonzentration

Vierfache Standardansätze (8 $\mu\text{g/ml}$ RNA-Polymerase, 40 $\mu\text{g/ml}$ $\phi\text{CL-DNA}$) wurden bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 125 μl entnommen und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt.

(■—■): 64 mM Mg^{++} , 140 mM K^+
(x—x): 8 mM Mg^{++} , 50 mM K^+

3.3. Einfluß von Transkriptionsinhibitoren

Die enzymatische Reaktion wurde sowohl durch Inhibitoren, die die Struktur der DNA ändern wie Actinomycin und Proflavin, als auch durch solche, die direkt mit dem Enzym wechselwirken wie Heparin (62) und Rifampicin (73) gehemmt (Tab. 3).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß Heparin eine bestimmte Fraktion der DNA-gebundenen E.coli-RNA-Polymerase (den "stabilen Präinitiationskomplex", s. Diskussion) nicht hemmt. Für diese Insensitivität gegenüber Heparin ist die stöchiometrische Beteiligung des Initiationsfaktors σ erforderlich (62,81,82). Analoge Versuche mit B.stearothermophilus-RNA-Polymerase an T4 - oder SP50-DNA zeigten keinen vergleichbaren Schutzeffekt, wobei offen blieb, ob dies eine Eigenschaft dieses Enzyms ist oder auf Abwesenheit des σ -Faktors zurückzuführen war (62). Bei dem hier untersuchten Enzym aus B.cereus führte Präinkubation mit homologer ϕ CL-DNA trotz Anwesenheit von σ ebenfalls nicht zu einem Schutz vor der Heparinwirkung (Abb. 14, Tab.4), der mit den Verhältnissen an E.coli zu vergleichen wäre. Wie im Anhang gezeigt wird, ist dies auch bei σ -haltigem B.stearothermophilus-Enzym nicht der Fall.

Tab. 4: Wirkung von Heparin

RNA-Polymerase und DNA wurden in Phase I 10 Minuten vor-inkubiert. In Phase II wurde entweder nur Tris-HCl-Puffer oder 80 μ g Heparin in Tris-HCl-Puffer zugegeben und für die angegebenen Zeiten weiterinkubiert. RNA-Synthese (Phase III) wurde 10 Minuten erlaubt. Siehe hierzu auch Legende der Abb. 14! (Angabe der Aktivität in nMol 14-C-AMP-Einbau).

Zusatz in Phase II	Länge der Phase II (Min.)	RNA-Synthese (nMol)
Puffer	10	3.600
Heparin	0.5	0.010
Heparin	10	0.002

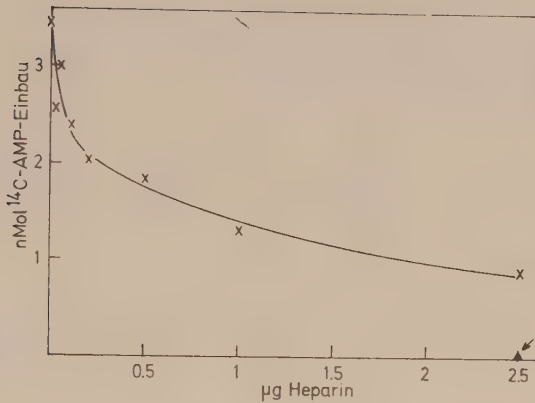


Abb. 14: Hemmung der RNA-Synthese durch Heparin

Je 4 µg RNA-Polymerase-Vollenzym aus *B.cereus* T wurden mit 10 µg ØCL-DNA in Tris-HCl-Puffer (0.03 M Tris-Cl, 0.008 M Mg (CH₃COO)₂, 0.05 M KCl, pH 8.3) in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 37° C für 10 Minuten inkubiert (Phase I); danach wurde die indizierte Menge Heparin in 25 µl Tris-HCl-Puffer zugegeben und 1 Minute bei 37° C weiterinkubiert (Phase II). Anschließend wurden 125 µl Substratmischung (0.5 mM GTP, CTP, UTP, 14-C₈-ATP in Tris-HCl-Puffer zugegeben und RNA-Synthese für 10 Minuten bei 37° C erlaubt (Phase III).

Der Kontrollwert (keine Vorinkubation) ist ein normaler Standardansatz mit gleicher Menge RNA-Polymerase und DNA; er enthielt jedoch 10 µg/ml Heparin (▲)

3.4 Vergleich der enzymatischen Aktivität aus vegetativen und sporulierenden Zellen

Die oben untersuchten Parameter waren bei den Enzymen aus vegetativen und sporulierenden Zellen identisch. Das besondere Augenmerk galt einer möglichen Änderung in der Matrizen-Spezifität der RNA-Polymerase, bei *B.subtilis* als charakteristisch für die Sporulation beschrieben (36-41,45). Eine solche Änderung konnte bei den hier aus

Tab. 5: Matrizenspezifität der RNA-Polymerase von vegetativen und sporulierenden Zellen von B.cereus
(ohne KCl)

Über DNA-Agarose gereinigte Enzyme aus den indizierten Stadien wurden in Gegenwart sättigender Mengen DNA im Standardansatz für 10 Minuten inkubiert. Minimal-enzym stammt aus sporulierenden Zellen (t_3). In Klammer ist jeweils die Relation zur Aktivität an ds- ϕ CL-DNA, die gleich 1 gesetzt wurde, angegeben.

Matrize	veg. Zellen	Spezifische Aktivität d. Vollenzyms aus sporulierenden Zellen			Spez. Akt. des Minimal-enzym
		1.5 h	3 h	12 h	
	mE/mg protein				
ϕ CL DNA	92	80	115	102	12
Poly d(A-T)	24 (0.26)	22 (0.28)	25 (0.22)	20 (0.20)	16 (1.33)
B.cereus DNA	15 (0.16)	21 (0.27)	12 (0.10)	12 (0.12)	8 (0.66)
T4 DNA	15 (0.16)	12 (0.15)	15 (0.13)	14 (0.14)	3 (0.25)
T5 DNA	52 (0.57)	51 (0.64)	67 (0.53)	49 (0.48)	13 (1.08)
T7 DNA	55 (0.61)	40 (0.50)	68 (0.59)	44 (0.43)	14 (1.17)

Tab. 6: Matrizenspezifität der RNA-Polymerase von vegetativen und sporulierenden Zellen von B.cereus
(Anwesenheit von 0.2 M KCl)

Wie Tab. 5 . Die Ansätze enthalten jedoch zudem 0.2 KCl.

Matrize	veg.Zellen	Spezifische Aktivität d. Vollenzyms aus sporulierenden Zellen			Spez.Akt. des Minimal-enzym
		1.5 h	3 h	12 h	
	mE/mg protein				
ϕ CL DNA	127	125	152	141	11
Poly d(A-T)	8 (0.06)	5 (0.04)	11 (0.07)	11 (0.08)	16 (1.45)
B.cereus DNA	5 (0.04)	8 (0.06)	4 (0.03)	6 (0.04)	7 (0.64)
T4 DNA	6 (0.05)	2 (0.02)	6 (0.04)	-	3 (0.27)
T5 DNA	67 (0.53)	60 (0.48)	78 (0.51)	79 (0.56)	8 (0.73)
T7 DNA	5 (0.04)	1 (0.01)	4 (0.03)	3 (0.02)	2 (0.18)

B.cereusT isolierten Enzymen nicht beobachtet werden (Tabellen 5,6). Die DNA des B.cereusT-Phagen ØCL war für sämtliche Enzyme die wirksamste Matrize, die Aktivität an synthetischem Polyd(AT) betrug ihr gegenüber zwischen 20 und 28 %. Darüberhinaus war auch kein signifikanter Unterschied in der Relation zu einer anderen DNA zu beobachten. Die Aktivität von Vollenzym ließ sich an ØCL-DNA durch Zugabe von 0.2 M KCl steigern, unabhängig davon, aus welchen Stadien die Enzyme isoliert worden waren. Vergleicht man damit die Salzabhängigkeit von Minimalenzym (Definition siehe unten), fällt auf, daß dessen Aktivität an ØCL-DNA von der Erhöhung der Salzkonzentration nahezu unbeeinflusst bleibt (Tab. 5,6).

4. Auftrennung des Enzyms in σ -Faktor und Minimalenzym

Die obigen Versuche zur Struktur und Aktivität der RNA-Polymerase wurden mit Präparationen durchgeführt, bei denen weitere Trennverfahren nicht zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität führten. Dieses sog. "Vollenzym" ließ sich jedoch in ein Enzym mit geringerer spezifischer Aktivität an Phagen DNA, in ein sog. "Minimalenzym", und den Initiationsfaktor σ zerlegen. Eine Kombination der getrennten Teile führte zur Rekonstitution des Vollenzym. Diese Versuche, die zu einer detaillierteren Aussage über die Enzymeigenschaften führen, sind im Folgenden dargestellt.

4.1. Chromatographie an Phospho-Cellulose

Die von BURGESS et al. beschriebene Methode, RNA-Polymerase aus E.coli über Phospho-Cellulose-Chromatographie in ein Minimalenzym und einen Initiationsfaktor σ aufzutrennen (54), führte bei der RNA-Polymerase aus B.cereusT zu einem vergleichbaren Ergebnis. Allerdings war es not-

wendig, unspezifische Bindungsstellen der Phospho-Cellulose vor der eigentlichen Chromatographie mit einem Schutzprotein wie Rinderserum-Albumin abzusättigen. Wurde auf diesen Schritt verzichtet, war außer einem hohen Proteinverlust eine nahezu vollständige Inaktivierung des eluierten Enzyms zu beobachten. Bei höheren als hier eingesetzten Proteinmengen könnte sich eine solche Vorbehandlung als überflüssig erweisen.

Es wurden drei Proteingipfel erhalten. Der erste (I) stellt den Säulendurchfluß dar und enthält σ . Proteingipfel II, in der Folge "Vollenzym" genannt, enthielt alle vier Untereinheiten der RNA-Polymerase und wurde mit 0.25 M KCl von der Säule eluiert. Proteingipfel III, in der Folge "Minimalenzym" genannt, enthielt nur die drei Untereinheiten β, β' und α ; er wurde mit 0.35 M KCl eluiert (Abb. 15,16). Deutlich unterschied sich die enzymatische Aktivität der Gipfel II und III, in einer Weise, die die Bezeichnungen Voll- bzw. Minimalenzym rechtfertigt (74): vergleichbar hohe Aktivität zeigten beide Enzyme an Polyd(AT); an ϕ CL-DNA war Vollenzym um einen Faktor 3.3 mehr, Minimalenzym um einen Faktor 3.1 weniger aktiv als an Polyd(AT). Dieser Unterschied ist nur auf die Gegenwart der Untereinheit σ , dem Peptid vom Molekulargewicht 56 000, zurückzuführen. Wurde zu beiden Enzymen σ zugegeben, blieb die Aktivität von Vollenzym an ϕ CL-DNA unverändert, diejenige von Minimalenzym wurde erhöht (Abb. 17). Die an Polyd(AT) gemessene Aktivität blieb in beiden Fällen unbeeinflusst von der Zugabe von σ . Die Stimulierung der Minimalenzym-Aktivität an Phagen-DNA verlief konzentrationsabhängig: bereits substöchiometrische Mengen an σ -relativ zu α - hatten eine Aktivitätserhöhung zur Folge. Eine Titration einer gegebenen Konzentration von Minimalenzym mit steigenden Mengen an σ führte schließlich zu einem Sättigungswert, der auch durch überstöchiometrische Mengen σ nicht verändert wurde (Abb. 17,18).

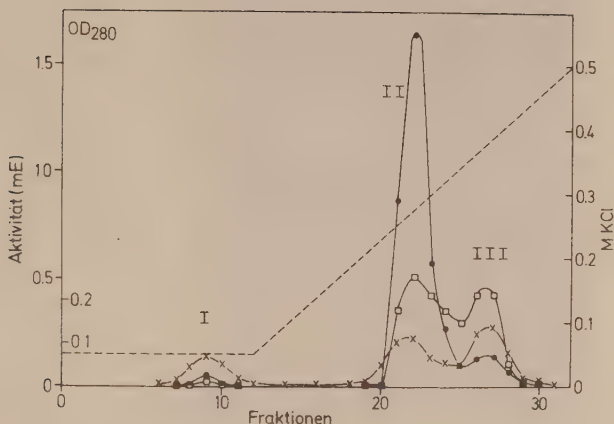


Abb. 15: Trennung der RNA-Polymerase aus sporulierenden Zellen über eine Phospho-Cellulose-Säule

2 mg RNA-Polymerase (aus t_3 -Zellen, gereinigt über ØCL-DNA-Agarose) wurde über eine Phospho-Cellulose-Säule (0.4 x 5 cm) getrennt (54). 1 ml Fraktionen wurden gesammelt und 10 µl Proben auf enzymatische Aktivität an 12 µg ØCL-DNA (●—●) oder 5 µg Polyd(AT) (□—□) getestet. Proteinkonzentration ist als Absorption bei 280 nm gegeben (x—x). (----) ist die KCl-Konzentration im Elutionspuffer (Meth.).

Der stimulierende Einfluß von σ auf Minimalenzym wurde von der Salzkonzentration im Testansatz stark beeinflusst: bei niedrigen Konzentrationen (20 mM Mg^{++} , 30 mM K^+) wurde die Aktivität 5-fach erhöht, demgegenüber bei hohen Konzentrationen (20 mM Mg^{++} , 200 mM K^+) um einen weiteren Faktor 2.3 gesteigert (Abb. 17). Dieser Salzeffekt ist sehr gut mit dem Einfluß von monovalenten Salzen auf die Aktivität von Vollenzym zu vergleichen (Abb. 10 und Tabellen 5,6). Minimalenzym selbst war weitgehend unabhängig von der Salzkonzentration in diesem Bereich (nicht abgebildet).

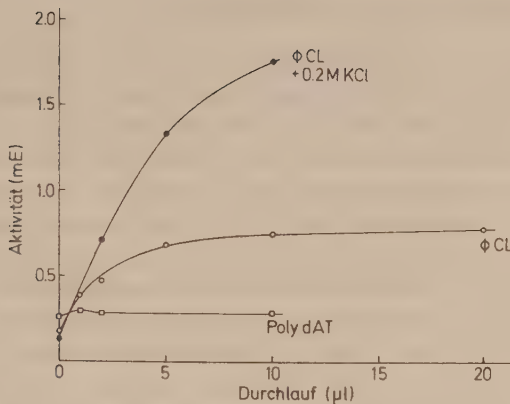


Abb. 17: Aktivierung des Minimalenzym durch den σ -Faktor

Die Aktivität von Minimalenzym (20 µl Proteingipfel III der Abb. 15) wurde in Gegenwart verschiedener Mengen σ an 12 µg ØCL-DNA (●—●), 12 µg ØCL-DNA und 0.2 M KCl (●—●) oder an 5 µg Polyd(AT) (□—□) getestet.

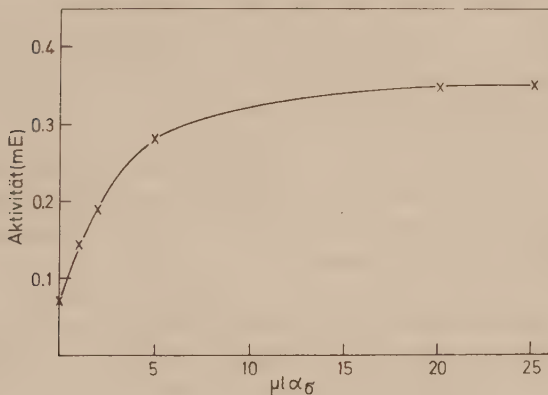


Abb. 18: Stimulierung des Minimalenzym durch elektrophoretisch gewonnene σ -Fraktion

6.2 µg Minimalenzym (t_1 -Zellen) wurden mit steigenden Mengen (α, σ)-Fraktion aus t_2 -Zellen - dargestellt wie in Abb. 6 und im Methodenteil beschrieben - im Standardansatz (ohne KCl) inkubiert. Proteinkonzentration der (α, σ)-Fraktion ca. 0.15-0.2 mg/ml.

4.2. Elektrophoretische σ -Gewinnung

Eine σ -enthaltende Fraktion konnte auch mit einer weiteren Methode dargestellt werden. Dazu wurde die in Abb. 6 gezeigte elektrophoretische Trennung auf Cellulose-Acetatfolien präparativ durchgeführt (Meth.). Die α - σ -Fraktion erhöhte die Aktivität von Minimalenzym in vergleichbarer Weise wie die σ -Durchflußfraktion der Phospho-Cellulose-Chromatographie. (Abb. 18). Die elektrophoretische war dabei der säulenchromatographischen Methode insofern überlegen, als damit σ -Aktivität aus weniger Ausgangsmaterial (z.B. 50-100 μ g RNA-Polymerase) in reinerer Form (ohne jegliche Eigenaktivität), vor allem einfacher, schneller und konzentrierter zu gewinnen war. Inwieweit α und σ einen Komplex bilden, der mit der elektrophoretischen Methode nicht getrennt wird oder ob nur zufällig die Ladungsdichten beider Untereinheiten im gewählten System gleich groß sind, wurde nicht definitiv entschieden. Die zweite Erklärung scheint jedoch wahrscheinlicher.

4.3. Vergleich der Minimalenzyme und σ -Faktoren aus vegetativen und sporulierenden Zellen

So wie bei der elektrophoretischen Auftrennung lieferten vegetatives Vollenzym und die Vollenzyme aus verschiedenen Sporulations-Stadien auch bei Chromatographie an Phospho-Cellulose das gleiche Elutionsprofil. Insbesondere sei betont, daß das Peptid mit Molekulargewicht 56 000 (σ) auch in der Durchlaufraktion gefunden wurde, wenn Enzym aus sporulierenden Zellen chromatographiert wurde. Die Verhältnisse der Aktivitäten an Phagen-DNA (ϕ CL) und Polyd(AT) wie auch die Zusammensetzung aus Untereinheiten waren in allen Stadien in den Proteingipfeln II und III (s. Abb. 15) identisch. Minimalenzym aus sporulierenden Zellen wurde durch den zugehörigen σ -Faktor genauso wie durch denjenigen aus vegetativen Zellen stimuliert. (Abb. 17,18).

4.3.1. Katalytische σ -Aktivität in den Vollenzymen

Es wäre denkbar, daß der σ -Faktor in isolierten Enzymen aus sporulierenden Zellen nicht oder nur teilweise aktiv ist und erst nach seiner Isolierung voll wirksam werden kann, etwa infolge der gleichzeitigen Abtrennung eines Inhibitors. Ein derartiger "Anti- σ -Faktor" wurde für *B. subtilis* postuliert (75,76). Da aus sporulierenden Zellen wenige, jedoch charakteristische Peptide zusammen mit der RNA-Polymerase gereinigt wurden (Abb. 8), kann diese Möglichkeit nach den bisher beschriebenen Versuchen nicht völlig ausgeschlossen werden. Der im Folgenden beschriebene Versuch zeigt aber, daß σ in allen isolierten Vollenzymen katalytisch aktiv vorliegt, nicht gestört von der Anwesenheit zusätzlicher Peptide: wurde reines Minimalenzym (t_3) mit Vollenzymen aus verschiedenen Wachstumsphasen (t_{-1} , $t_{1.5}$, t_3 oder t_{12}) inkubiert, so war die Gesamtaktivität weit höher als auf Grund der Addition bei getrennter Inkubation zu erwarten wäre (Tab. 7). Die Aktivierungsfaktoren (bis ca. 10, Tab. 7) waren gut mit demjenigen des gereinigten σ -Faktors am selben Minimalenzym zu vergleichen.

Tab. 7: Aktivität des Minimalenzymys in Gegenwart von Vollenzymen verschiedener Stadien

Vollenzyme aus verschiedenen Zellen (t_{-1} bis t_{12}) wurden im Standardansatz an ϕ CL-DNA in An- oder Abwesenheit von 2.8 μ g Minimalenzym aus t_3 -Zellen getestet. Die Differenz beider Werte zeigt die Aktivität des stimulierten Minimalenzymys im gemischten Ansatz.

Enzym	Menge (μ g)	14-C-AMP-Einbau (pMol)		
		allein	+ Minimalenzym	Differenz
Minimalenzym (t_3)	2.8	315	-	315
Vollenzym (t_{-1})	2.1	2607	6081	3474
Vollenzym ($t_{1.5}$)	1.9	2358	4675	2317
Vollenzym (t_3)	5.5	8828	11469	2641
Vollenzym (t_{12})	2.4	3366	5409	2043

4.4. Überkreuzstimulierung von Minimalenzymen und σ -Faktoren verschiedener Organismen

In verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, daß die stimulierende Wirkung von σ nicht auf das Minimalenzym der eigenen Spezies beschränkt sein muß (37,70,77,78). Dies gilt auch für *B.cereus*T, wie im Folgenden dargestellt ist.

4.4.1. Minimalenzym und σ -Faktor aus *E.coli*

Für dieses Experiment wurden außerdem drei Matrizen gewählt, die aus theoretischen Gründen (s.z.B. 74) eine σ -spezifische Reaktion erwarten ließen: 1) eine doppelsträngige, Einzelstrang-bruchfreie DNA, -native $\phi\mu$ 4-DNA (79), 2) eine hitzedenaturierte, damit weitgehend einzelsträngige DNA, -erhitzte $\phi\mu$ 4-DNA, 3) synthetisches Polyd(AT). Wenn σ beteiligt ist am Erkennen und Aufschmelzen spezifischer, doppelsträngiger DNA-Bereiche (Promotoren) (74), sollte seine Wirkung nur im Fall 1, jedoch nicht im Fall 2

und nicht bzw. wenig im Fall 3 zu beobachten sein. In Tab. 8 wurden die Daten dieses Versuches zusammengestellt. Der jeweils "homologe" σ -Faktor führte zu einer 10-fachen Aktivitätserhöhung der Minimalenzyme aus *E. coli* bzw. *B.cereus*T, wenn native DNA vorgelegt wurde, diese blieb erwartungsgemäß aus, wenn die DNA zuvor hitzedenaturiert wurde. Unterschiede zeigten sich an Polyd(AT): während *E.coli* σ -Faktor das eigene Minimalenzym um einen Faktor 4 erhöhte, wurde im analogen Fall bei *B.cereus*T-Polymerase kein Effekt beobachtet. Dies stimmt mit anderen Versuchen an *E.coli* (66) bzw. *B.cereus*T (Abb. 17) überein. Bei Überkreuz-Kombinationen konnte der *E.coli* σ -Faktor an *E.coli*-Minimalenzym durch *B.cereus*T σ sowohl qualitativ wie quantitativ ersetzt werden (Tab. 8). Dagegen war das *B.cereus*T-Minimal-Enzym zwar ebenfalls von *E.coli* σ -Faktor in qualitativ gleicher Weise wie durch den eigenen σ -Faktor beeinflusst, jedoch fiel die Steigerung an nativer DNA erheblich geringer aus (Faktor 2.5 gegenüber 10).

Auffallenderweise wurde *E.coli*-Minimalenzym vom homologen wie heterologen σ stimuliert, *B.cereus*T-Minimalenzym jedoch weder vom homologen noch heterologen σ , wenn Polyd(AT) vorgelegt wurde. Da gezeigt wurde, daß σ an der Bildung eines Präinitiationskomplexes am Promotor beteiligt ist (80,81), kann man annehmen, daß Polyd(AT) mit *E.coli*-Enzym in der Weise eines spezifischen Promotors reagiert, *B.cereus*T Enzym jedoch eine andere Promotorspezifität besitzt. Es zeigt sich weiterhin, daß die Matrizenspezifität der σ -Wirkung nur vom Minimalenzym bestimmt ist im Einklang mit der These, σ sei eher ein Effektor als ein Adaptor (82).

Tab. 8: Vergleich der Stimulierung der Minimalenzyme aus B.cereusT und E.coli durch die σ -Faktoren aus B. cereusT und E. coli

Je 5 μ g Minimalenzym aus B.cereusT (t_{-1} -Zellen) bzw. E. coli wurden unter Standardbedingungen in An- oder Abwesenheit von σ -Faktoren (ca. 2 μ g) aus B.cereusT (t_{-1} -Zellen, aus Cello-gel-Trennung) oder E.coli (isoliert über Phosphocellulosechromatographie) inkubiert.

Matrize	Aktivität d.Minimalenzyms (pMol 14-C-AMP-Einbau)			(pMol 14-C-AMP-Einbau)		
	B.cereusT			E.coli		
	allein	+ σ -B.c.	+ σ -E.c.	allein	+ σ -E.c.	+ σ -B.c.
$\phi\mu 4$, nativ	43	430	105	350	3433	3139
$\phi\mu 4$, denaturiert	118	106	140	1490	1591	1589
Polyd(AT)	125	119	159	1154	4701	4791

4.4.2. σ -Faktoren weiterer Prokaryonten

Minimalenzyme aus B.cereusT wurde auch von σ -Faktoren stimuliert, die aus RNA-Polymerasen mit stark abweichenden Aktivitätseigenschaften stammten. Dies ist in Tab. 9 dargestellt für den Fall des σ -Faktors aus B.stearothermophilus (siehe auch Anhang), dessen Vollenzym in vitro bei 50° C optimale Synthese zeigt (71). Die Aktivität des Minimalenzyms von B.cereus T wurde bei 37° C, der optimalen Synthesetemperatur für dieses Enzym, durch den heterologen σ -Faktor aus B.stearothermophilus bei dem angegebenen Mengenverhältnis um einen Faktor 4 erhöht. Der Sigma-Faktor aus L.curvatus (70) führte unter den Versuchsbedingungen zu einer dreifachen Aktivitätssteigerung. Hier muß jedoch kritisch angemerkt werden, daß im letzteren Fall nur über-stöchiometrische Mengen σ verwendet wurden; der Befund bestätigt jedoch Ergebnisse von STETTER und ZILLIG, daß der σ -Faktor einer Mn-abhängigen RNA-Polymerase prinzipiell in der Lage ist, ein Mg-abhängiges Minimalenzym (dort: E.coli Enzym) zu aktivieren (70).

Tab. 9: Aktivierung von B.cereusT-Minimalenzym durch
 σ -Faktoren verschiedener Prokaryonten

Je 3.1 μ g Minimalenzym aus B.cereusT wurden unter Standardbedingungen an ϕ CL-DNA getestet (+ 0.125 M KCl). Die σ -Faktoren wurden jeweils elektrophoretisch gewonnen (s. Abb. 6 und 32). σ aus L.curvatus war ein Geschenk von Dr. K. Stetter. Die σ -Faktoren waren frei von Eigenaktivität im Einbaustest. Aktivitäten sind angegeben als pMol-14-C-AMP-Einbau in säureunlösliches Material.

σ -Faktor (μ g)	Aktivität (pMol)	Stimulierung (-fach)
-	313	-
σ B.cereus (0.06)	1035	3.3
(0.3)	1750	5.5
σ B.stearo- thermophi- lus (0.2)	996	3.2
(0.4)	1306	4.1
σ L-curvatus (6.0)	1040	3.3

5. Stadienspezifische Peptide, assoziiert mit DNA-abh.
RNA-Polymerase oder DNA

Nach den vorangegangenen Kapiteln sind Grundstruktur ($\beta\beta'\alpha_2$) σ und Aktivität der isolierten DNA-abh.RNA-Polymerasen unabhängig von der Wachstumsphase der Bakterien. Aus diesen Versuchen geht jedoch nicht zwingend hervor, ob die isolierten Enzyme repräsentativ sind für die Gesamtheit aller RNA-Polymerase-Moleküle in den aufgeschlossenen Zellen, wenn auch die jeweils gleichartigen Reinigungsdaten (Tab. 1) bereits dafür sprechen. Zweitens ist denkbar, daß ein oder mehrere Peptide in bestimmten Wachstumsphasen zusätzliche Untereinheiten bilden und mit den bisherigen Methoden nicht erfaßt wurden. So wurden auch im besser untersuchten E.coli-System mehrere Proteine gefunden, die die Syntheseleistung von Vollenzym in vitro erhöhen bzw. erniedrigen (siehe Review 74). Zusätzliche, die Transkriptionsspezifität von B.subtilis-Enzym ändernde Peptide ließen sich auch nach Infektion von B.

subtilis mit Phagen finden (56). Eine Änderung der Matrizenspezifität von Vollenzym ist auch als Folge der Wirkung von Proteinen denkbar, die eine Affinität zur DNA zeigen, wie z.B. das CAP-Protein bei E.coli (83).

Die folgenden Versuche bestätigen, daß während der Isolierung keine hypothetische β_m -Untereinheit verloren wurde, außerdem stadienspezifische Proteine nachgewiesen werden können, die als Kandidaten für mögliche regulatorische Proteine in Betracht zu ziehen sind.

5.1. Immuno-Präzipitation der DNA-abh. RNA-Polymerase

Gereinigte RNA-Polymerase (t_3) wurde einem Kaninchen injiziert und in der Folge wurde ein Anti-Serum gegen RNA-Polymerase gewonnen. Wurde dieses Anti-Serum mit nicht oder nur wenig gereinigten Bakterienextrakten inkubiert, wurde die RNA-Polymerase durch die Antikörper selektiv präzipitiert. Durch nachfolgende Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS konnten die Untereinheiten β, β' und α gut dargestellt werden (Abb. 19), nicht jedoch σ (die große Untereinheit des Antikörpers hat ein ähnliches Molekulargewicht, 65). Wie in Abb. 19 ebenfalls ersichtlich, wurden nur wenige Peptide kopräzipitiert.

β und β' waren in Präparationen aller Wachstumsphasen in einem Verhältnis 1:1 enthalten, ein Peptid " β_m " mit etwas kleinerem Molekulargewicht (37) konnte nicht beobachtet werden. Die kopräzipitierten Peptide sind mindestens zum Teil stadienspezifisch (Abb. 19). Dies gilt besonders für die Peptide P_{11} (nur t_{-1}), P_{17} (nie t_{-1} , ab $t_{1.5}$), P_{38} und P_{40} (ab t_3). Müssen die Peptide P_{17} , P_{38} und P_{40} auch als stadienspezifisch angesehen werden, so dürfte ihre Kopräzipitation mit der RNA-Polymerase mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf eine Assoziation mit RNA-Polymerase zurückzuführen sein. Das benutzte Anti-Serum wurde mit einer RNA-Polymerase aus t_3 -Zellen hergestellt, die - bedingt durch die Reinigung (s.u.) - Spuren dieser

Peptide enthielt; gegen sie gerichtete Anti-Körper dürften deshalb im Anti-Serum enthalten sein. Für P_{11} trifft eine solche Erklärung nicht zu (kein P_{11} in t_3 -Zellen und damit auch nicht dagegen immunisiert).

P_{47} und P_{68} , gelegentlich kopräzipitiert wie in Abb. 19, waren im Gegensatz zu den aufgeführten Peptiden allen Stadien gemeinsam.

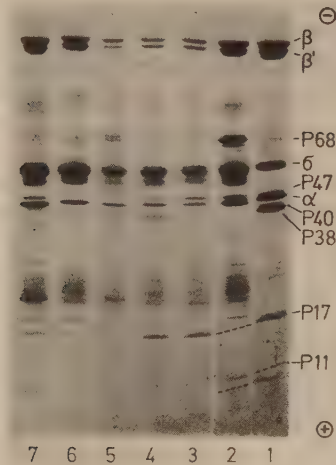


Abb. 19: SDS-Polyacrylamid(5-25 %)-Gelelektrophorese von Antikörper-präzipitierter RNA-Polymerase

Je 100 μ l über DEAE-Cellulose gereinigte Rohextrakte (Tab. 23) aus Zellen verschiedener Wachstumsstadien wurden mit 50 μ l Antiserum gegen RNA-Polymerase wie im Methodenteil beschrieben inkubiert und die erhaltenen Präzipitate auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

- 1 :Vollenzym (t_3), mit P_{17} und P_{40} , ohne Antikörperpräzipitation
- 2-6:Antikörper-Präzipitate aus t_{-1} , $t_{1.5}$, t_3 , t_5 und t_{12} -Zellen
- 7 :Antikörperpräzipitate aus t_{-1} -Zellen, die mit ϕ CL-infiziert sind (siehe Anhang)

5.2. Begleitproteine während der Reinigung

RNA-Polymerase aus vegetativen Zellen enthielt neben andern Begleitpeptiden nach Reinigung über einen Dichtegradienten (Abb. 3) ein Peptid vom Molekulargewicht 32-34 000. Dieses Peptid konnte im Gegensatz zu den übrigen Verunreinigungen über DEAE-Cellulose-Chromatographie nicht von der RNA-Polymerase abgetrennt werden, wohl aber über DNA-Affinitätschromatographie (Abb. 5). In einigen Fällen wurde ein Peptid gleicher oder ähnlicher Größe unabhängig von der Wachstumsphase auch aus Rohextrakten zusammen mit der RNA-Polymerase durch Antikörper präzipitiert (s.z.B. Abb. 19). Im Standardtest wurde die Aktivität durch die Gegenwart dieses Peptids nicht beeinflusst.

Die Peptide P_{17} , P_{38} und P_{40} wurden bei der Reinigung der RNA-Polymerase aus t_3 -Zellen über ϕ CL-DNA-Agarose mitisoliert. Die Peptide binden jedoch etwas stärker an die DNA-Säule als RNA-Polymerase, sie wurden nur teilweise überlappend eluiert (Gradientenelution) (siehe auch Abb. 16, 19). Die starke Bindung dieser Peptide an Einzelstrang-DNA kann nicht mit besonderer Basizität erklärt werden: bei Trennung nach Ladungsdichte waren die Peptide weniger basisch als β' (im Gegensatz zu den kleinen Peptiden, die unterhalb einer Salzkonzentration von 0.4 M NaCl von der Säule eluierten); P_{17} war weit saurer als irgendeine Untereinheit des Enzyms. Auch diese Peptide zeigten keinen Einfluß auf die Aktivität des Vollenzyms. Über DNA-Cellulose gereinigte RNA-Polymerasen aus t_3 -Zellen enthielten diese Peptide nicht.

Peptid P_{62} , aus t_{12} -Zellen zusammen mit der RNA-Polymerase an Einzelstrang-DNA-Agarose isoliert (Abb. 8), wurde durch Antikörper nicht zusammen mit RNA-Polymerase aus Rohextrakten präzipitiert (s. Abb. 19). Über seine Funktion ist ebenfalls nichts bekannt.

5.3. Doppelstrang-DNA-bindende Proteine

Wenig gereinigte Rohextrakte ("R 100", Tab. 23) wurden über ds-Kalbsthymus-DNA-Cellulose nach ALBERTS chromatographiert (58). Die mit steigender Salzkonzentration eluierten Proteine wurden auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS analysiert. Bei dieser Methode wurden neben RNA-Polymerase nur wenig Peptide bei Salzkonzentrationen oberhalb von 0.4 M NaCl auf der Säule festgehalten. Einige dieser Proteine waren allen Stadien gemeinsam, z.B. solche vom Molekulargewicht 12 000, 20 000, 22 000 und 98 000, andere dagegen nur in bestimmten Stadien zu finden.

Dabei fiel auf, daß besonders in der "reversiblen" Sporulationsphase ($t_{1.5}$) eine Anzahl neuer Peptide auftaucht, z.B. vom Molekulargewicht 36 000, 45 000, 61 000 und 78 000 (Tab. 10).

Eine Reihe von stadienspezifischen ds-bzw. ss-DNA-Cellulose-bindenden Proteinen wurden von BREHM et al. bei *B. subtilis* charakterisiert, die den hier beschriebenen ss- bzw. ds-DNA-bindenden Peptiden bezüglich Stadienspezifität und Molekulargewicht teilweise auffällig ähnlich sind (84). Obwohl auch von mir bisher eine Funktion in der Sporulation nicht nachgewiesen werden konnte, fehlen sie zum Teil in einer asporogenen *B. subtilis*-Mutante in der Stationären Phase (85).

Tab. 10: DNA-Cellulose-bindende Peptide

Zentrifugationsüberstände ("R100", s.Tab. 23) von aufgeschlossenen Zellen (je 1 g) der indizierten Stadien wurden auf 20 ml verdünnt und über ds-Kalbthymus-DNA chromatographiert wie in der Legende der Abb. 29 beschrieben (Kap. 8). Nur die Peptide sind aufgeführt, die zwischen 0.45 und 1.0 M NaCl in TEMEG-Puffer eluiert wurden und deren Vorkommen bzw. Intensität (symbolisiert durch Anzahl der Kreuze) sich in den einzelnen Stadien änderten. Ein Minus bedeutet Fehlen des Peptids im entsprechenden Stadium. Die Peptide wurden durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese aufgetrennt, ihre Größe mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte der Untereinheiten der RNA-Polymerase bestimmt.

Molekulargewicht	Wachstumsstadien			
	t ₋₁	t _{1.5}	t ₃	t ₅
107 000	-	+	-	-
87 000	+	++	++	+
78 000	-	++	+	+
61 000	-	+++	+	+
45 000	-	+	+	+
36 000	-	+	+	+
34 000	+	+	-	-
27 000	-	+	-	-
24 000	+++	+	++	-

6. Aktivität der DNA-abh. RNA-Polymerase in Rohextrakten

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, lassen sich aus *B.cereus*T einige stadienspezifische Peptide isolieren. Diese kann man insofern als potentielle Modulatoren der Transkriptaseaktivität betrachten, als sie entweder an DNA binden oder zusammen mit der DNA-abh.RNA-Polymerase gereinigt werden. Für keines dieser Peptide konnte jedoch tatsächlich eine Beeinflussung der Transkription bewiesen

werden - , wie dies auch bisher bei keinem der stadienspezifischen, in gleicher Weise charakterisierten Peptide gelungen ist, die in verschiedenen Labors für *B. subtilis* beschrieben wurden (84-93).

Die Schwierigkeit, eine Stimulierung oder Hemmung der Transkription *in vitro* durch diese Peptide nachzuweisen, kann unter anderem folgende Ursachen haben

- 1) die charakterisierten Peptide beeinflussen auch *in vivo* die Transkription nicht und sind deshalb für die hier gestellte Problematik völlig uninteressant; man sollte dann erwarten, daß die interessanten Peptide in weniger fraktionierten Zellextrakten noch enthalten sind,
- 2) unter den erwähnten Peptiden sind zwar auch "Transkriptionsfaktoren", sie wurden aber während der Reinigung inaktiviert oder entfalten ihre Wirksamkeit erst in Gegenwart weiterer Faktoren, wie z.B. für das sog. "CAP"-Protein bei *E. coli* beschrieben (94); in wenig fraktionierten Zellextrakten sollte die Chance höher sein, die benötigten Faktoren in intakter Form vorzufinden;
- 3) die von reiner RNA-Polymerase *in vitro* gut transkribierten Phagen-DNAs tragen nicht die notwendigen Signale, wie verschiedenartige Promotoren, Operatoren oder Terminationsorte, die die RNA-Polymerase in Gegenwart von Faktoren zu einer Änderung ihrer Spezifität zwingen würden (Inkompetenz der DNAs).

Diese Unwägbarkeiten legten es nahe, von dem bisher benutzten Transkriptionssystem aus definierten Komponenten - RNA-Polymerase, DNA plus isolierter "Faktor" - abzugehen und zu versuchen, die Existenz von vermuteten stadienspezifischen Transkriptionsfaktoren in einem komplexen System zu untersuchen, z.B. zusammengesetztaus isolierter DNA plus Rohextrakt als Quelle für RNA-Polymerase und "Faktoren". Sofern sich dann Unterschiede im Transkriptionsverhalten einzelner Stadien finden lassen, könnte man versuchen, das System zu fraktionieren und nach den

entscheidenden Komponenten suchen. Freilich sind solche Systeme nicht ohne Nachteil: man muß in einem unbekannten Ausmaß mit störenden Nebenreaktionen rechnen, die die Aktivitätsbestimmung der RNA-Polymerase erschweren können und kaum vermieden werden können. Als solche Störfaktoren sind vor allem Nukleasen (DNAsen und RNAsen) sowie Proteasen zu nennen, wie sich noch zeigen wird.

Testet man Rohextrakte von Bacilluszellen, z.B. aus der vegetativen Phase von *B.cereus* oder *B.subtilis*, an gereinigter Phagen-DNA auf Transkriptaseaktivität, kann man feststellen, daß die Höhe der spezifischen Aktivität starken präparationsbedingten Schwankungen unterworfen ist. Ist damit bereits ein Vergleich der Transkriptaseaktivitäten von Präparationen aus Zellen gleichen Wachstumsstadiums nicht einfach, läßt sich ein Vergleich der Transkriptaseaktivitäten von Rohextrakten aus verschiedenen Wachstumsstadien erst recht schwierig anstellen. Aus diesem Grund hat man nach einer Größe gesucht, die weniger präparationsbedingten Schwankungen unterliegt. Hierzu eignet sich das Verhältnis der RNA-Polymerase-Aktivität an verschiedenen Matrizen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß dieses Verhältnis - z.B. Aktivität an ϕ CL-DNA : Aktivität an Polyd(AT) - im Gegensatz zu den Absolutaktivitäten in verschiedenen Präparationen gleicher Ausgangszellen geringen Schwankungen unterliegt und damit als Charakteristikum der Transkriptionsspezifität eines Zellstadiums angesehen werden kann. Vergleicht man nun möglichst viele Matrizen, indem man die Aktivitäten auf diejenige von z.B. ϕ CL-DNA bezieht, sollte die Chance hoch sein, eine Änderung der Matrizenpezifität der Transkriptase während der Sporulation, ausgedrückt in veränderten Aktivitätsverhältnissen, zu beobachten. Derartige Untersuchungen wurden auch mit Rohextrakten von *B.subtilis* durchgeführt und führten dort dazu, von einer Änderung der Matrizenpezifität der RNA-Polymerase während der Sporulation zu sprechen (95-98).

Im Folgenden sind Ergebnisse beschrieben, die mit Rohextrakten aus verschiedenen Stadien von *B.cereus*-Zellen erhalten wurden.

6.1. Transkriptaseaktivität im kompletten Zellextrakt

Weitgehend vollständig sind cytoplasmatische Proteine und niedermolekulare Substanzen in durch niedertourige Zentrifugation erhaltenen Überständen von lysierten Zellen enthalten. Solche Roh-Präparationen ("R30", siehe Schema der Tab. 23) eigneten sich jedoch nur beschränkt für weitere Studien. Der Einbau von säurelöslicher Radioaktivität in säurefällbares radioaktives Material konnte bei allen Rohextrakten durch Anwesenheit von fremder (exogener) DNA gesteigert werden (Tab. 11); die Erhöhung der Radioaktivität in säureunlösliches Material ließ sich durch Rifampicin verhindern, d.h. bei diesem Anteil handelte es sich um ein Produkt der DNA-abh. RNA-Polymerase. Außerdem war jedoch zu beobachten, daß Rifampicin-Zugabe auch einen Teil der Einbau-Aktivität inhibierte, die in Abwesenheit von zugesetzter DNA gemessen wurde (Tab. 11). Dieser Anteil muß auf RNA-Synthese an endogener, bakterieller DNA zurückgeführt werden. Ein weiterer Teil der ohne Anwesenheit von exogener DNA erzielten Einbau-Aktivität war durch den Transkriptase-Inhibitor Rifampicin nicht zu hemmen; er muß auf andere als RNA-Polymerase-Aktivität zurückgeführt werden. Es zeigte sich außerdem, daß nur die DNAs der Phagen ØCL und T 5 in der Lage waren, als "fremde" Matrizen zu fungieren. Abgesehen davon, daß die Transkriptaseaktivität in Rohextrakten aus sporulierenden Zellen etwas geringer war, ließ sich kein prinzipieller Unterschied zu derjenigen aus vegetativen Zellen feststellen.

Tab. 11: Transkriptaseaktivität im Rohextrakt ("R30")

Je 10 μ l Zentrifugationsüberstand ("R 30", Tab. 23, Meth., 86-200 μ g Protein) von Homogenaten aus 2 g Zellen der indizierten Stadien wurden im Standardansatz in Abwesenheit fremder DNA (-DNA), Anwesenheit von 16 μ g ϕ CL-DNA (+ DNA) oder Anwesenheit von 16 μ g ϕ CL-DNA und Rifampicin (4 μ g/ml) (+ Rif) getestet.

Stadium	Aktivität (pMol 14-C-AMP-Einbau/mg Protein/min)		
	-DNA	+DNA	+Rif
t ₋₁	56	1165	19
t _{1.5}	109	882	23
t ₃	36	706	15
t ₅	57	646	21
t ₁₂	80	921	24

6.2. Transkriptaseaktivität im fraktionierten Zelleextrakt

Im obigen System haben sich vor allem die endogenen Nukleinsäuren als störend erwiesen. Diese konnten über DEAE-Cellulose-Chromatographie abgetrennt werden : bei 0.25 M NH_4Cl in Puffer TEAG blieben die Nukleinsäuren an DEAE-Cellulose adsorbiert, während die meisten Proteine, darunter die DNA-abh.RNA-Polymerase, nicht daran gebunden wurden. Im Gegensatz zu dem obigen "R30"-System war die "Einbau-Aktivität" dieser Proteinfraction strikt von der Anwesenheit einer "fremden" Matrize abhängig und , wie sich aus der vollständigen Hemmbarkeit durch Rifampicin zeigt, nur auf RNA-Synthese durch die DNA-abh.RNA-Polymerase zurückzuführen. Diese Extrakte waren daher für weitergehende Untersuchungen geeignet

6.2.1. Matrizenspezifität während der Sporulation

Unter Bedingungen, bei denen die Transkriptaseaktivität linear von der zugesetzten Proteinmenge (ca. 100 µg/Standardtest) und der Inkubationszeit (5 bis 10 Min.) abhängig war, wurde an der DNA des *B.cereus*T-Phagen ØCL jeweils die höchste RNA-Synthese beobachtet, unabhängig davon, ob Proteinextrakte aus vegetativen oder sporulierenden Zellen verwendet wurden (Tab. 12). Die relativen Aktivitäten (gegenüber ØCL-DNA) an den DNAs der Phagen Øµ4 und T5 sowie an synthetischem Polyd(AT) änderten sich in Proteinextrakten aus t_{-1} bis t_3 -Zellen praktisch nicht, waren in Extrakten aus späteren Sporulationsstadien (t_5 - t_{12} -Zellen) aber signifikant herabgesetzt. Eine andere "Klasse" von Matrizen bildeten T7-, *B.cereus*T- und Kalbsthymus-DNA. Ihre relativen Aktivitäten blieben in allen untersuchten Stadien nahezu unverändert. Diejenige an Einzelstrang-DNA stieg dagegen im Laufe der Sporulation an (Tab. 12).

Tab. 12: Matrizenspezifität der Transkriptase in Rohextrakten aus verschiedenen Stadien

DEAE-Cellulose-Fractionen (Tab. 23 im Methodenteil) verschiedener Wachstumsphasen wurden mit den aufgeführten Matrizen für 5 und 10 Minuten bei 37° C im Standardansatz inkubiert. Die Transkriptase-Aktivitäten wurden normiert auf den jeweiligen Wert an ds-ØCL-DNA und stellen Durchschnittswerte aus beiden Inkubationszeiten dar. Proteinmengen: 45 - 62 µg. Aktivitäten an ØCL-DNA (nMol/mg/min): $t_{-1} = 11.4$; $t_{1.5} = 3.7$; $t_3 = 3.7$; $t_5 = 2.3$; $t_{12} = 5.6$

Matrize (DNA)	Relative Aktivität (ØCL = 100 %)				
	t_{-1}	$t_{1.5}$	t_3	t_5	t_{12}
ØCL, ds	100	100	100	100	100
Polyd(AT)	29.3	-	28.8	22.8	16.4
Øµ4	21.1	20.0	18.0	15.2	12.7
T5	37.2	37.8	34.0	26.5	22.7
T7, ds	12.5	5.0	11.3	10.0	11.6
T7, ss	0.6	1.1	0.5	5.7	4.2
<i>B.cereus</i> T	12.9	9.3	16.5	11.7	12.1
Kalbsthymus	12.0	6.2	12.1	9.0	9.3

Diese Ergebnisse scheinen für eine gewisse, wenn auch geringe Änderung der Matrizenpezifität während der Sporulation zu sprechen. Bei diesen Tests müssen jedoch erhebliche Verfälschungen der tatsächlich vorhandenen Transkriptase-Aktivität durch Nukleasen und/oder Proteasen befürchtet werden. Hierfür spricht, daß die gemessene "Netto-RNA-Synthese" an ϕ CL-DNA und Polyd(AT) in unterschiedlicher Weise von der Synthesezeit abhing. Während in t_{-1} -Extrakten das Verhältnis Nettosynthese an ϕ CL-DNA zu Nettosynthese an Polyd(AT) innerhalb einer Synthesezeit bis zu 40 Min. nahezu konstant blieb (Faktor 4) und größenordnungsmäßig mit demjenigen von isoliertem Enzym übereinstimmte, war dies in Extrakten aus t_5 -Zellen nicht der Fall. Das Verhältnis betrug hier bei einer kurzen Synthesezeit (bis maximal 10 Min) wie bei t_{-1} -Extrakten annähernd 4; bei längerer Synthesezeit war aber die an ϕ CL-DNA gemessene Aktivität auf den Wert der Nettosynthese an Polyd(AT) herabgesetzt (Verhältnis 1, Tab. 13).

Tab. 13: Matrizenverhältnis in Abhängigkeit von der Synthesezeit

Je 10 μ l über DEAE-Cellulose gereinigte Rohextrakte (Tab. 23, Meth.) aus vegetativen (t_{-1}) bzw. sporulierenden (t_5)-Zellen wurden im Standardansatz mit ϕ CL-DNA oder Polyd(AT) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Das Matrizenverhältnis ist angegeben als Verhältnis der Transkriptaseaktivität an ϕ CL-DNA : Transkriptaseaktivität an Polyd(AT).

Inkubations- dauer (Min)	Matrizenverhältnis (ϕ CL-DNA/Polyd(AT))	
	t_{-1}	t_5
5	4.13	3.83
10	4.95	4.41
20	4.51	1.15
40	3.56	0.92

Für dieses Verhalten bieten sich hauptsächlich zwei Erklärungen an: a) bei ungestörter RNA-Synthese besonders starker Abbau der an Phagen-DNA kodierten RNA, nicht aber der an Polyd(AT) kodierten RNA durch "Sporulations-RNasen"; b) in vegetativen und sporulierenden Zellen vergleichbarer Abbau der Produkte, jedoch Störung der Synthese an Phagen-DNA, nicht aber oder nur wenig an Polyd(AT). Die Störung der Synthese könnte in einer Inaktivierung der Matrize (durch eine DNase) oder des Enzyms (durch einen "Faktor" oder eine Protease) zu suchen sein. Wie im Folgenden gezeigt wird, ist die Erniedrigung der bei Langzeitinkubation an Phagen-DNA meßbaren säureunlöslichen Radioaktivität während der Sporulation nicht auf einen verstärkten Abbau zurückzuführen, sondern auf eine proteolytische Inaktivierung der RNA-Polymerase, die eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Synthese und Abbau der RNA bewirkt.

6.3. Abtrennung einer Protease

Variation der DEAE-Cellulose-Behandlung durch Abtrennung einer "Wasch-Fraktion" von der RNA-Polymerase (Schema der Tab. 23) führte zur Erhöhung der Transkriptase-Aktivität. Der Aktivierungsfaktor war für vegetative und sporulierende Zellen deutlich verschieden: er betrug bei t_{-1} -Zellen nur 1.6, bei t_5 -Zellen dagegen 8.0 (Tab. 14). Im Gegensatz dazu änderte sich die Matrizenspezifität der RNA-Polymerase aus den einzelnen Stadien (t_{-1} bis t_{12}) nicht signifikant gegenüber derjenigen des oben beschriebenen unfractionierten Systems (Tab. 12).

Die besondere Aktivitätserhöhung bei t_5 -Zellen ist auf die Abtrennung einer Protease zurückzuführen. Dafür sprechen die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Tab. 14: Transkriptaseaktivität nach Fraktionierung von Rohextrakten

Rohextrakte aus vegetativen (t_{-1}) bzw. sporulierenden (t_5) Zellen wurden fraktioniert wie im Schema der Tab. 23 (Meth.) angegeben. Die spezifische Aktivität der Transkriptase an ϕ CL-DNA wurde unter Standardbedingungen ermittelt.

Fraktion	Aktivität (nMol/min/mg Protein)	
	t_{-1}	t_5
DEAE-Cellulose	13.1	2.7
Subfraktion I	20.2	21.3
Subfraktion II	1.4	0.1

Tab. 15: Proteaseaktivität in Rohextrakten

Die nach dem Schema der Tab. 23 (Meth.) fraktionierten Rohextrakte wurden an Azocasein auf Proteaseaktivität getestet. Angabe der Aktivität in "mg Azocasein hydrolysiert pro Stunde und mg Rohextrakt-Protein".

Fraktion	Stadium	Aktivität
DEAE-Cellulose	t_{-1}	0
R 30	t_5	4.4
DEAE-Cellulose	t_5	6.4
Subfraktion I	t_5	0
Subfraktion II	t_5	8
P-Fraktion	t_5	91.5

In Gegenwart breiter Konzentrationen der abgetrennten Proteine aus t_5 -Zellen wurde auch die Transkriptaseaktivität in t_{-1} -Extrakten erniedrigt; dies zeigte sich besonders deutlich, wenn über längere Zeit (z.B. 40 Min.) inkubiert wurde (Abb. 20). Erhitzen der "Waschfraktion" (10 Min. 100°C) zerstörte deren hemmende Wirkung (Abb. 20). Ein kleines Molekül wie eine RNase sollte eine solche Behandlung überstehen. Über eine Ammoniumsulfatfraktionierung der "Waschfraktion" konnte die Hemmaktivität stark angereichert werden (Tab. 15 und 23). Die angereicherte "P-Fraktion" wurde verwendet, um modifizierte Aktivitätsbestimmungen der Transkriptase durchzuführen, um dadurch die Art der Hemmung zu entdecken.

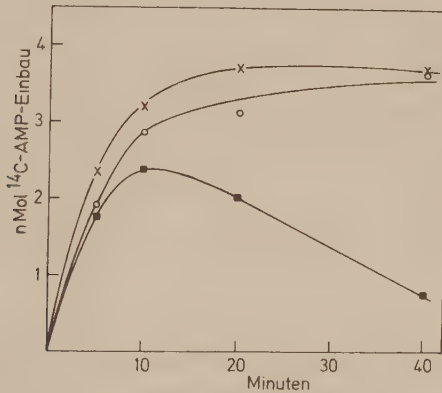


Abb. 20: Hemmung der Transkriptaseaktivität in Rohextrakten aus vegetativen Zellen durch eine Proteinfraktion aus sporulierenden Zellen

Über DEAE-Cellulose gereinigter t_{-1} -Extrakt ($32\ \mu\text{g}$ Protein) wurde in Abwesenheit (x—x) oder Anwesenheit von Subfraktion II aus t_5 -Zellen ($30\ \mu\text{g}$; s. Tab. 23) (■—■) bzw. hitzebehandelter Subfraktion II ($30\ \mu\text{g}$, 10 Min. bei 100°C) (o—o) im Standardansatz für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert und anschließend die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt.

Tab. 16: a) Einfluß der P-Fraktion (t_5) auf die Transkriptaseaktivität im Rohextrakt (t_{-1})

Die angegebenen Komponenten wurden in Gegenwart von Mix S (Meth.) für 30 Minuten bei 37° C vorinkubiert, anschließend jeweils die fehlenden Komponenten für vollständigen Testansatz zugegeben (Start der Synthesephase mit ATP) und 10 Minuten Synthese bei 37° C erlaubt. Es wurden eingesetzt: 40 µg/ml ØCL-DNA; 300 µg/ml DEAE-Cellulose-Fraktion (t_{-1}) als Transkriptase-haltige Präparation ("Transkriptase"); 24 µg/ml P-Fraktion aus T_5 -Zellen ("Protease"). Die Aktivität der Transkriptase ist angegeben als nMol 14-C-AMP-Einbau in säureunlösliches Material.

Vorinkubation	Synthesephase	
	Protease	Transkriptase-Aktivität(nMol)
-	-	8.7
-	+	4.9
DNA + Protease	+	6.4
DNA + Transkriptase	-	7.5
DNA + Transkriptase	+	7.4
Transkriptase + Protease	+	0.8

b) Einfluß der P-Fraktion (t_5) auf RNA

Je 1 µg gereinigte RNA-Polymerase wurde im Standardansatz (ØCL-DNA) für 10 Minuten inkubiert, dann die Synthese durch Zugabe von 80 µg/ml Actinomycin gestoppt, anschließend 6 µg P-Fraktion (t_5) zu dem Ansatz 3 gegeben. Probe 1 wurde sofort säuregefällt (Kontrolle), Proben 2 + 3 zuvor für 40 Minuten bei 37° C nachinkubiert. Die Menge der RNA im Ansatz ist angegeben als nMol 14-C-AMP-Einbau in säurefällbares Material.

No.	Nachinkubation	RNA (nMol 14-C-AMP)
1	Kontrolle	1.32
2	Actinomycin	1.16
3	Actinomycin + P-Fraktion	1.20

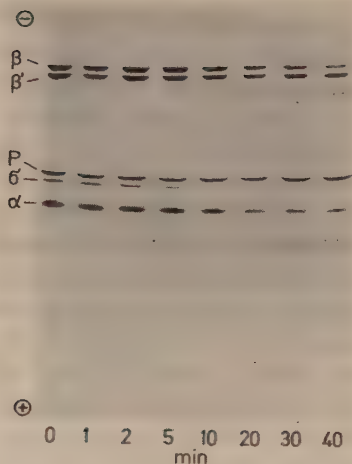


Abb. 21: Proteolytische Spaltung von RNA-Polymerase-Untereinheiten

25 µg gereinigte RNA-Polymerase wurde im Standardansatz (jedoch ohne DNA) in Gegenwart von 6 µg "P-Fraktion" (Tab. 23) aus t_5 -Zellen bei 37° C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 20 µl entnommen und diese nach Denaturierung mit "Probenpuffer" (Meth) auf einem SDS-Polyacrylamidgel (5-25 % Polyacrylamid) aufgetrennt. P = Pyruvatkinase, enthalten im Standardansatz.

Präinkubation von "P-Fraktion" mit DNA führte nicht zu einer verstärkten Inhibition, wie für eine DNase zu erwarten wäre. Nachinkubation von gestopptem Syntheseansatz mit "P-Fraktion" führte nicht zu einer Abnahme der säurefällbaren Radioaktivität, wie man bei einer RNase erwarten würde (Tab. 16). Präinkubation von Transkriptase und "P-Fraktion" resultierte in maximaler Hemmung der Nettosynthese (Tab. 16). Wurden jedoch DNA und Transkriptase unter Bedingungen inkubiert, die die Bildung eines "Präinitiationskomplexes" erwarten lassen (80,81), führte die Anwesenheit der "P-Fraktion" nicht zu einer Hemmung der Nettosynthese (Tab. 16). Die Ergebnisse deuten bereits

auf eine direkte Inaktivierung der Transkriptase hin, die Art der Inaktivierung ist proteolytisch: "P-Fraktion" und ihre weniger gereinigten Vorstufen zeigten starke proteolytische Aktivität an Azocasein als Modells substrat (Tab. 15), DNA-abh. RNA-Polymerase selbst ist ein Substrat für diese Protease. Wurde nämlich gereinigte DNA-abh. RNA-Polymerase mit der "P-Fraktion" unter den Ionenbedingungen des Standardansatzes, jedoch in Abwesenheit von DNA, inkubiert und die Kinetik dieser Reaktion auf SDS-Gel-Elektrophorese verfolgt, konnte eine Änderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten nachgewiesen werden (Abb. 21). Besonders die Menge der Untereinheit σ nahm ab, nach 20 minütiger Inkubation war es nur noch in Spuren vorhanden. Die großen Untereinheiten, bes. β , wurden ebenfalls teilweise hydrolysiert, wie aus dem gleichzeitigen Auftauchen neuer, relativ großer Peptide (Molekulargewicht etwa 110 und 113000) hervorging. Außerdem entstanden während der Reaktion zwei zusätzliche Peptide vom Molekulargewicht 20 000 und 23 000 (Die Molekulargewichte wurden mit den bekannten Molekulargewichten der RNA-Polymerase-Untereinheiten bestimmt).

6.4. DNA-abh. RNA-Polymerase-Aktivität in Zellextrakten der proteasearmen Mutante B.cereusTC

Nachdem gezeigt wurde, daß die in sporulierenden Zellen gebildete Protease Untereinheiten der DNA-abh. RNA-Polymerase unter deren Testbedingungen zu spalten vermag, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß in den wenig gereinigten, protease-enthaltenden Transkriptase-Fractionen auch positive oder negative Modulatoren der Transkriptase-Aktivität in vitro inaktiviert wurden. Eine Verfälschung der in Tab. 12 zusammengefaßten Daten verursachen würde insbesondere die Inaktivierung eines hypothetischen "Anti-Sigma-Faktors". Einem für B.subtilis geforderten hypothetischen "Anti-Sigma-Faktor" wurde zum Beispiel eine hohe Abbaurate in vivo und physiologische Instabilität zugeschrieben (76), was für eine hohe Anfälligkeit eines derartigen Faktors gegen Proteolyse in vitro sprechen könnte.

Um dies zu prüfen, wurden Versuche der im vorigen Kapitel beschriebenen Art auch an der protease-armen Mutante B. cereusTC durchgeführt. Diese von ARONSON isolierte Mutante sporuliert mit gleicher Ausbeute wie der Wildstamm, produziert aber nur sehr wenig extra- wie intrazelluläre Proteasen (48). Unter den hier durchgeführten Wachstumsbedingungen betrug die Gesamtaktivität von extra- wie intrazellulärer Protease jeweils nur 6-7 % des Wildstammes (siehe auch Abb. 1). Die Untersuchungen zur Transkription in wenig gereinigten Zellextrakten sind im Folgenden dargestellt.

6.4.1. Keine Proteaseaktivität und keine Hemmung der Transkriptase

Spezifische Aktivitäten der Transkriptase in Extrakten aus vegetativen Zellen waren von gleicher Größenordnung wie beim Wildstamm; damit ist eine Voraussetzung für vergleichende Untersuchungen gegeben. Wurden Extrakte aus sporulierenden Zellen auf Transkriptase-Aktivität getestet, so fiel auf, daß auch bei längeren Inkubationszeiten der Verlauf der Kinetik demjenigen von t_{-1} -Zellextrakten glich. Da weder in t_5 - noch $t_{1.5}$, t_3 oder t_{12} -Extrakten der Mutante Proteaseaktivität an Azocasein meßbar war, andererseits sonst kein Unterschied zum Wildstamm bekannt ist (48), darf man annehmen, daß nur die Anwesenheit der Protease die in Wildstamm-Extrakten bei Langzeitinkubation vorge-täuschte niedrige Transkriptaseaktivität verursacht. Aus der Erhöhung der spezifischen Aktivität der Mutanten-Transkriptase bereits bei Kurzzeitsynthese muß man außerdem folgern, daß die Wildstamm-Transkriptase selbst bei nur kurzer Synthesezeit durch die Protease stark inhibiert wird. Dies stimmt mit dem Ergebnis überein, daß die Abtrennung der "Waschfraktion" in t_5 -Zellen des Wildstammes zu einer 8-fachen Aktivitätserhöhung der Transkriptase führte, in vegetativen nur zu einer 1.6 fachen.

6.4.2. Matrizenspezifität der Transkriptase während der Sporulation

Die DNA des *B.cereus* T Phagen ØCL war in wenig gereinigten Proteinextrakten aus allen untersuchten Entwicklungsstadien die wirksamste Matriz (Abb. 22), wie bereits bei entsprechenden Versuchen am Wildtyp (Tab. 12) bzw. für isoliertes Enzym (Tab. 2, 5, 6) beschrieben. Die relativen Aktivitäten (bezogen auf ØCL-DNA) an den übrigen Phagen-DNAs (Øµ4, T5, T7) blieben bis zur Zeit t_5 nahezu unverändert, ebenfalls diejenige an Polyd(AT). Ein geringer, jedoch signifikanter Unterschied zeigt sich dann, wenn die Matrizenspezifität an den beiden Endpunkten der Zeitskala (t_{-1} und t_{12}) verglichen wird: während die relativen Aktivitäten (bezogen auf ØCL-DNA) an T5- und Øµ4-DNA nahezu gleich hoch waren, war bei t_{12} -Extrakten gegenüber t_{-1} -Extrakten diejenige an Polyd(AT) leicht erhöht (41 gegenüber 32 %), diejenige an T7-DNA leicht herabgesetzt (8 gegenüber 18 %).

Zwar könnte dies ein Hinweis sein, daß die Promotorspezifität der Transkriptase verändert ist und zu einer Suche nach einem hierfür verantwortlichen Faktor ermutigen, doch liegen derartige Änderungen sehr spät auf der Zeitachse. In vivo läßt sich sehr viel früher eine Änderung der Transkription beobachten (21). Dementsprechend sollte man in vitro vor allem zwischen t_{-1} und $t_{1.5}$ bis maximal t_3 entscheidende Veränderungen erwarten.

Hier konnte jedoch - wie beim Wildtyp - praktisch keine Veränderung der Matrizenspezifität im Rahmen der versuchsbedingten Fehlerbreite beobachtet werden. In ähnlichen Versuchen an *B.subtilis*-Stämmen - alle mit normalem Proteasegehalt - wurde gerade in dieser Sporulationsphase eine sehr deutliche Änderung der Matrizenspezifität gemessen (95-98).

Auffälligerweise stieg, wie bereits beim Wildtyp beobachtet (Tab. 12), die relative Aktivität an Einzelstrang-DNA (bezogen auf diejenige an Doppelstrang-ØCL-DNA) während der

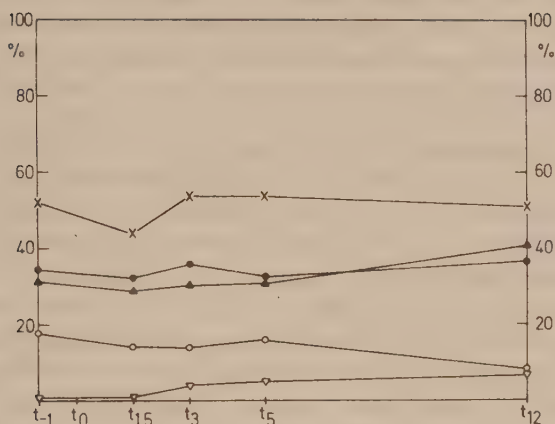


Abb. 22: Matrizenspezifität der Transkriptase während der Sporulation in Rohextrakten der protease-armen Mutante B.cereusTC

Über DEAE-Cellulose gereinigte Rohextrakte (ohne Abtrennung einer Wasch-Fraktion, s. Tab. 23) aus t₋₁ bis t₁₂-Zellen wurden mit den indizierten Matrizen für 10 Minuten bei 37° C im Standardansatz inkubiert. Die Aktivitäten an den einzelnen Matrizen wurden jeweils auf diejenige an doppelsträngiger ØCL-DNA (= 100 %) normiert. Proteinmengen 30-50 µg je Ansatz. (x—x) : Øµ4-DNA, (●—●):T5-DNA, (◐—◐):T7-DNA, (▲—▲):Polyd(AT), (▽—▽):hitzedenaturierte ØCL-DNA. Die spezifischen Aktivitäten an ds-ØCL-DNA betrugen (nMol/min/mg Protein): t₋₁:11.8; t_{1.5}:4.5; t₃:4.7; t₅:6.3; t₁₂:5.6.

Sporulation stark an; diese Änderung findet sogar in der Zeit statt, in der die reversible Sporulationsphase endet und der Weg zur Ausprägung der Spore irreversibel bestimmt ist (t₃) (Abb. 22). Inwieweit diese Änderung der Transkription von Einzelstrang-DNA tatsächlich ein Hinweis für eine Änderung der Transkriptionsspezifität während der Sporulation ist, bedarf der weiteren Klärung. In diesem Zusammenhang muß z.B. darauf hingewiesen werden, daß

die Aktivität von isoliertem Vollenzym an Einzelstrang-DNA immerhin ca. 8-9 % derjenigen an Doppelstrang-DNA beträgt (Tab. 2); die entsprechenden Werte der Transkriptase-Aktivität in Rohextrakten betragen dagegen unter 1 % (t_{-1} -Extrakt) bzw. 6.5 % (t_{12} -Extrakt).

Man könnte spekulieren, daß sich die Anwesenheit eines zusätzlichen Transkriptionsfaktors in den einzelnen Stadien auf das Verhältnis der Aktivität in Gegenwart von Mg^{++} zu der in Gegenwart von Mn^{++} -Ionen auswirkt, wie etwa für die beiden Transkriptaseformen I und II von *B.thuringiensis* beschrieben (99). Hierfür ließ sich jedoch bei *B.cereus*T kein Anhaltspunkt gewinnen. In Rohextrakten aus t_{-1} bis t_{12} -Zellen führte - wie bei isoliertem Enzym - die Anwesenheit von Mg^{++} zu einer 3- bis 6-fachen höheren Nettosynthese an Phagen-DNA, zu einer 2- bis 3-fach niedrigeren Nettosynthese an Polyd(AT) und Einzelstrang-DNA.

Aus der Aktivität an ϕ CL-DNA (Legende Abb. 22) einerseits und dem unveränderten Matrizenverhältnis andererseits (Abb. 22) geht - wie bereits aus der Tab. 11 ersichtlich ist - hervor, daß die spezifische Aktivität der DNA-abh. RNA-Polymerase während der Sporulation an allen doppelsträngigen Matrizen um etwa einen Faktor zwei herabgesetzt ist. Solche Änderungen sind jedoch nicht auf die Sporulation beschränkt; sie werden auch bei stationären Zellen asporogener *Bacillus*-Mutanten gefunden (100) und auch bei stationären Zellen von *E.coli* (101).

6.5. Transkription von *B.cereus*T DNA in vitro

Aus den oben beschriebenen Versuchen an der Mutante *B.cereus*TC konnte nicht auf die Anwesenheit eines Proteinfaktors geschlossen werden, der die Transkriptaseaktivität zwischen t_{-1} und t_5 , also bis zu Entwicklungsstadien, wo die Sporenbildung schon sehr weit fortgeschritten ist, in positiver oder negativer Weise beeinflusst.

Will man die attraktive Arbeitshypothese aufrechterhalten, daß Proteine dieser Art eine Rolle in vivo spielen, muß

man annehmen, daß solche Faktoren in vitro entweder in zu geringer Konzentration vorliegen, zu instabil sind, als daß sie mit den hier durchgeführten Methoden getestet werden könnten oder daß die vorgelegten Matrizen nicht die notwendigen Regulationssignale tragen. Können auch die beiden ersten Punkte zur Zeit prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, so sollte doch die natürlichste Matriz, *B.cereus*-DNA, die erforderlichen spezifischen Erkennungsbereiche tragen. Leider kann bakterielle DNA nur beschränkt intakt isoliert werden, im Gegensatz zu den "fremden", viel kleineren DNAs der Bakteriophagen. Dies ist sicher einer der Gründe für die relativ schlechte Prägereigenschaft bakterieller DNA in vitro. Freilich muß dieser Nachteil ein detailliertes Studium nicht ausschließen, vielmehr ist durchaus denkbar, daß an *B.cereus*-DNA zwar die Nettosynthese mit Rohextrakten verschiedener Stadien (t_{-1} bis t_{12}) vergleichbar niedrig ist, jedoch jeweils andere Bereiche dieser komplexen DNA überschrieben werden. Dies legt nahe, auch die Reaktionsprodukte der nur wenig gereinigten Transkriptaseaktivität an *B.cereus*-DNA zu analysieren. Versuche in dieser Richtung sind sehr Material- und Zeit-aufwendig, so daß im Rahmen dieser Arbeit nur erste Ergebnisse vorgelegt werden können.

6.5.1. Hybridisierung von in vitro-RNA an *B.cereus* DNA

Mit der Technik der DNA-RNA-Hybridisierung gelang der Nachweis, daß in vegetativen und sporulierenden Zellen synthetisierte "in vivo"-RNA nicht völlig identisch ist (20,21, 25-28). Diese Methode bietet sich damit auch für die hier untersuchte Problemstellung an. Hybridisierung in Lösung schien wegen des geringen Materialbedarfs am geeignetsten (102).

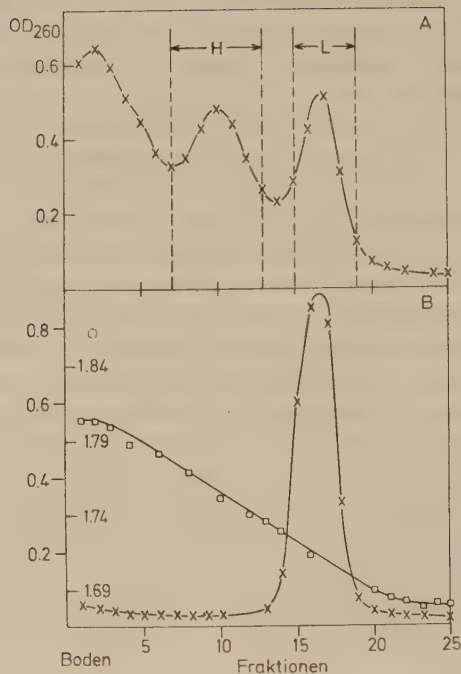


Abb. 23: CsCl-Gleichgewichts-Zentrifugation von *B. cereus* T-DNA in An-(A)- und Abwesenheit (B) von Poly(G,U) (Strangtrennung)

46 μg *B. cereus* T-DNA wurden in An- bzw. Abwesenheit von 100 μg Poly(G,U) in einer CsCl-Lösung der Dichte $\rho=1.73 \text{ g/cm}^3$ wie unter Methoden beschrieben zentrifugiert. Fraktionen a 0.1 ml wurden gesammelt und die optische Dichte bei 260 nm nach Verdünnen mit 0.2 ml 2XSSC-Puffer (Meth.) gegen denselben Puffer gemessen (x—x). Die Dichte der CsCl-Lösung wurde refraktometrisch bestimmt (□—□).

6.5.1.1. Trennung der B.cereus-DNA-Stränge

Selektive, d.h. asymmetrische RNA-Synthese läßt sich am besten durch Hybridisierung an getrennte DNA-Stränge nachweisen (102). OPARA-KUBINSKA et al. notierten eine Auftrennung von B.cereus-DNA in einen H- und einen L-Strang, wenn diese in Gegenwart von r-RNA bzw. PolyG (mit Spuren I) einer analytischen Gleichgewichts-Dichtegradienten-Zentrifugation unterworfen wurde (103). Die präparative Trennung, hier erstmals beschrieben, gelang erst dann, wenn statt PolyG das auch für ähnliche Trennungen an Phagen-DNA verwendete Poly(U_G) benutzt wurde (Abb. 23). Der Unterschied in der Schwimmdichte beider Stränge entsprach dem nach der Literatur zu erwartenden Wert von 0.03 g/cm^3 (103). Die beiden Banden, wie abgebildet vereinigt, wurden als H-Strang bzw. L-Strang bezeichnet, im Bewußtsein der Einschränkung, daß diese beiden Banden zwar jeweils einander komplementäres Material enthalten sollen, ohne dadurch notwendigerweise vom selben Strang zu sein (103).

6.5.1.2. Präparation von "in vitro-RNA"

Bei der Synthese von "in vitro-RNA" mußte besonders darauf geachtet werden, daß die zum Reaktionsansatz benötigten Komponenten keine in vivo synthetisierte RNA enthielten, da diese den nachfolgenden Hybridisierungsschritt beeinträchtigen würde. Als grobgereinigte Transkriptaseaktivität wurde deshalb die nukleinsäurefreie Proteinfraction nach Chromatographie an DEAE-Cellulose eingesetzt; doppelsträngige B.cereus-T-DNA, isoliert wie im Methodenteil beschrieben, wurde über einen Gleichgewichtsgradienten in CsCl von verbliebener RNA befreit. Unter leicht veränderten Standardbedingungen wurde eine hoch radioaktiv markierte RNA synthetisiert (Vorstufe 14-C-ATP mit 52 Ci/M). Die Ausbeuten dieser "in vitro-RNA" waren in beiden Präparationen (t_{-1} und t_3 -Extrakte) etwa gleich (ca. 3-4 μg).

6.5.1.3. Hybridisierung bevorzugt am H-Strang

Die in Lösung durchgeführte Hybridisierung erforderte sehr lange Inkubationszeiten; die hier gewählte Dauer von 41 Stunden bei 68° C reichte für zeitlich vollständige Hybridisierung aus.

Wurde eine bestimmte Menge radioaktiv markierter RNA mit 2 µg H- oder L-Strang inkubiert, so wurde am H-Strang jeweils erheblich mehr Radioaktivität hybridisiert (Tab. 17).

Geht man davon aus, daß die Hybridisierung an beiden Strängen prinzipiell gleich verläuft und z.B. am L-Strang nicht aus unbekannten Gründen gestört ist, so wurde im Fall der t_{-1} -RNA 74 %, im Fall der t_3 -RNA 82 % an den H-Strang der *B.cereus*T-DNA hybridisiert (Tab. 17).

Tab. 17: Hybridisierung von in vitro synthetisierter RNA an getrennte Stränge von *B.cereus*T-DNA

Durchführung der Hybridisierung wie im Methodenteil beschrieben. Die Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 200 µl 2 µg H- bzw. L-Strang und 3920 cpm RNA, die mit Rohextrakt aus vegetativen Zellen (t_{-1}) synthetisiert wurden bzw. 4250 cpm RNA, die mit Rohextrakt aus sporulierenden Zellen (t_3) synthetisiert wurden. Jeder Wert wurde dreimal bestimmt, die Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Der Blindwert von 40 cpm (ohne DNA-Strang im Hybridisierungsansatz) ist abgezogen. Nach der spezifischen Radioaktivität der Vorstufe 14-C-ATP (52 Ci/M) und der Annahme einer statistischen Verteilung von AMP, GMP, CMP, und UMP in der synthetisierten RNA entsprechen 870 cpm 10 ng RNA.

RNA	Hybridisierung (cpm 14-C-AMP auf Filter)					
	H-Strang		L-Strang		H + L-Strang	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
t_{-1}	971	74	342	26	1313	100
	(± 30)		(± 35)			
t_3	1106	82	241	18	1347	100
	(± 43)		(± 28)			

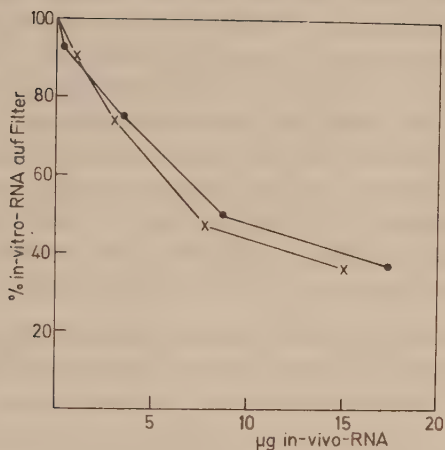


Abb. 24: Kompetitive Hybridisierung von "in-vitro-RNA"
durch steigende Mengen "in-vivo-RNA"

Je 2 µg H-Strang wurden mit 3920 cpm radioaktiver "in-vitro-RNA" aus t_1 -Zellen (x—x) bzw. 4250 cpm aus t_3 -Zellen (•—•) in Gegenwart steigender Mengen "in-vivo-RNA" (aus t_1 -Zellen isoliert) für 41 Std. bei 68° C inkubiert und die auf Membranfiltern wie beschrieben gesammelte Radioaktivität bestimmt (Meth.). Ohne Kompetitor-RNA wurden 975 (t_1) bzw. 1110 (t_3) cpm bestimmt und jeweils als 100 % bezeichnet. Die Werte in Gegenwart von "in-vivo-RNA" sind hierauf bezogen. Zur Markierung der "in-vitro-RNA" siehe Text!

In Gegenwart von nicht radioaktiv markierter "in-vivo-RNA", die aus vegetativen Zellen isoliert wurde, war die Hybridisierung von radioaktiv markierter "in-vitro-RNA" mit dem H-Strang geringer (kompetitive Hybridisierung, Abb. 24). Dazu waren hohe Mengen "in-vivo-RNA" notwendig; die Kompetierung war unter den Versuchsbedingungen nicht vollständig. Es bestand kein prinzipieller Unterschied zwischen "vegetativer"- und "Sporulations-in-vitro-RNA": beide wurden im gleichen Ausmaß von in-vivo-RNA kompetiert. Dies änderte sich auch dann nicht, wenn in-vivo-RNA verwendet wurde, die aus t_3 - statt t_{-1} -Zellen stammte.

Damit ließ sich auch mit einer solchen Versuchsanordnung bisher kein Unterschied in der Transkriptionsspezifität von Rohextrakten aus vegetativen und sporulierenden Zellen ermitteln. Dies könnte vielleicht dann gelingen, wenn Extrakte aus späteren Sporulationsstadien (z.B. t_5 statt t_3) eingesetzt werden. Unterschiede könnten außerdem dann zu beobachten sein, wenn zur Kompetierung reine m-RNA aus vegetativen bzw. sporulierenden Zellen statt der gesamten und damit vorwiegend ribosomalen RNA verwendet wird.

ANHANG

7. Der B.cereus T-Phage ØCL

Über den von SRINIVASAN (72) isolierten Phagen ØCL liegen in der Literatur bislang keine Angaben vor. Erste Versuche hatten gezeigt, daß die isolierte Nukleinsäure des Phagen eine gute homologe Matrize für die in dieser Arbeit beschriebene DNA-abh. RNA-Polymerase des Wirtes B.cereusT ist.

Es lag deshalb nahe, den Phagen und insbesondere seine Nukleinsäure näher zu untersuchen.

7.1. Zucht und Reinigung

Der Phage ØCL läßt sich nach SRINIVASAN auf seinem Wirt B.cereusT nur in einem nährstoffreichen, wenig definierten und zur Zellsynchronisation nicht geeigneten Medium vermehren (72, Medium NBY, Meth.). In Medium G (12), das besonders gut geeignet ist, um B.cereusT während definierter, in allen Zellen synchron ablaufender Sporulationsstadien zu studieren, ließ sich der Phage nicht propagieren. Aus diesem Grund war es nicht möglich, die Phagen-Infektion und Produktion im Laufe der Sporulationsstadien von B.cereusT zu untersuchen. Beobachtungen von SRINIVASAN zufolge kann ØCL in sporulierenden B.cereusT-Zellen (in Medium NBY) nicht vermehrt werden (72). Beste Ausbeuten an Phagen wurden erhalten, wenn eine logarithmisch wachsende B.cereusT-Kultur (32° - 36° C, Generationszeit 36-45 Min.) bei einem Zell-titer von $3-5 \times 10^8$ Bakterien/ml mit einer Multiplizität von 1 - 5 Phagen pro Bakterium angeimpft wurde. Zur Vermehrung der Phagen war bei diesem Schritt die Anwesenheit von CaCl_2 (0.016 %) absolut notwendig, wie z.B. auch für Øµ4 berichtet (79). Während einer Latenzzeit von 30-60 Min. nahm die Trübung der Kultur - und damit die Zahl der Bakterien - kaum zu, sank jedoch dann während der Lysezeit ab bis

auf nahezu den Wert von reinem Kulturmedium (Abb. 25). 90-120 Minuten nach erfolgter Infektion war die Lyse vollständig; normalerweise enthielt das Lysat $1-5 \times 10^{10}$ Phagen /ml (gemessen als Plaque-bildende Partikel (pfu.) auf einem B-cereusT-Bakterienrasen). Die Plaques waren einheitlich, klar und relativ klein ($\varnothing$ ca. 0.5 mm).

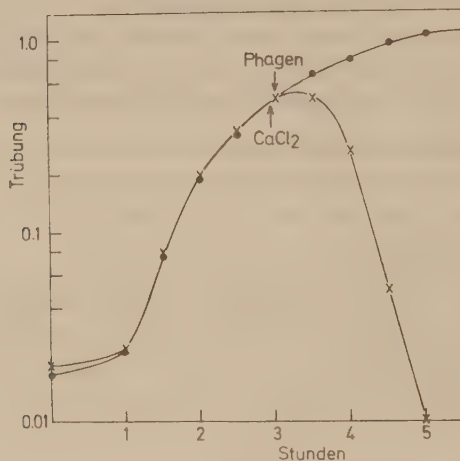


Abb. 25: Verlauf der Wachstumskurve von B.cereusT bei Infektion mit dem Phagen ØCL

Die optische Trübung einer B.cereusT-Kultur (1 l, NBY-Medium, 32°C) wurde zu den angegebenen Zeiten nach Animpfen mit einer 100 ml Übernachtskultur in 5 ml Proben bestimmt. Zu den indizierten Zeiten (Pfeile) wurden 10 ml CaCl_2 (Endkonzentration 0.016 M) und 100 ml Phagenlysat (10^{12} pfu) zugegeben (x—x). (●—●) Kontrollansatz ohne Phagen.

Für präparative Zwecke wurden die Phagen aus 12 l-Lysaten isoliert. Eine erste Konzentrierung konnte mit einer Polyäthylenglykol-Fällung erreicht werden. Bei einer Konzentration von 8 % Polyäthylenglykol 6000 waren nach Zentrifugation 95-98 % der Phagen (pfu) im Sediment zu finden. Diese Phagen wurden in 100 ml NBY-Kulturmedium aufgenommen

und wie für $\phi\mu 4$ beschrieben über einen diskontinuierlichen CsCl-Dichtegradienten gereinigt (79). Nach 12-stündiger Zentrifugation im Ausschwingrotor SW 27 (Beckmann, L5, 20 000 upm) bildeten die Phagen eine scharfe Doppelbande in der Dichtestufe 1.55 g/cm^3 . Die Phagen-Banden wurden vorsichtig mit einer stumpfen, weitkanuligen Spritze entnommen, mit CsCl der Dichte 1.55 g/cm^3 verdünnt und über Gleichgewichts-Dichtegradienten-Zentrifugation von restlichen Verunreinigungen befreit (SW 50.1, 48 Stunden, 40 000 upm). Auch hier sammelten sich die Phagen wieder in zwei scharfen Banden mit nur geringem Dichteunterschied. Beide Banden wurden vereinigt und zur DNA-Reinigung gegen den erforderlichen Puffer dialysiert.

Bei den Zentrifugationsschritten über CsCl wurden gelegentlich weitere, sehr dünne Banden beobachtet. Dabei dürfte es sich - wie in vergleichbaren Präparationen anderer Phagen (79) - um Phagenköpfe (schwerere Bande) bzw. Schwänze und Phagenhüllen (leichte Banden) handeln. Ausgeschlossen werden muß, daß es sich um Verunreinigungen mit andern Phagen handelt: elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Phagenkonzentrats, das auf andere Art erhalten wurde (Meth), ließ nur auf die eine Population von Phagen schließen, die auch in den beiden vereinigten Banden des CsCl-Dichtegradienten enthalten war (Abb. 26). Eine Erklärung für das Auftreten der Doppelbande kann nicht gegeben werden; die aus den getrennten Banden isolierten DNAs waren in Kontrollversuchen nach den hier angewandten Kriterien identisch.

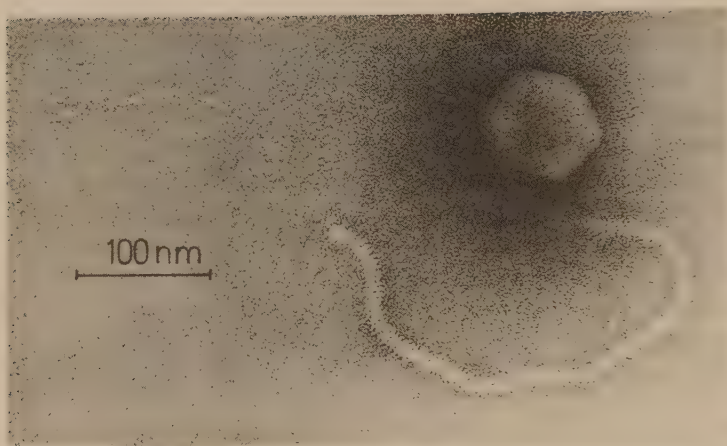


Abb. 26: Der Phage ØCL

Elektronenmikroskopische Aufnahme nach Positivkontrastierung mit Uranylacetat. Originalvergrößerung 120 000-fach. Für die Aufnahme danke ich Dr. A. Jacobson.

7.2. Morphologie

Die elektronenoptische Darstellung des Phagen zeigt einen Aufbau, der an andere Bacillus-Phagen erinnert, wie an die B.cereus Phagen PBC 1 und TP 50 (105) oder den B.subtilis-Phagen PBS 1 (106). Den Dimensionen nach (Tab. 18), sowohl bei Kopf, Schwanz und besonders Schwanzfaser, ist ØCL unter die großen Bacillusphagen einzureihen. In Tab. 18 sind diese Daten den Dimensionen der beschriebenen B.cereus-Phagen sowie dem hier ebenfalls benutzten B.stearothermophilus-Phagen Øµ4 (79) gegenübergestellt. Hiernach besteht keine Identität zu einem dieser Phagen. Nach den hier gemachten elektronenoptischen Beobachtungen scheint der Schwanz nicht kontraktile zu sein, jedoch wurden zu dieser Fragestellung keine besonderen Versuche durchgeführt.

Tab. 18: ØCL und andere B.cereusT-Phagen

Phage	Dimensionen (nm)			DNA		Literatur
	Kopf	Schwanz	Fiber	Daltons	% (G+C)	
ØCL	80x80	450x12	250x5	ca. 100×10^6	35	
CP51	90x90	160x20	-	58×10^6	43	(133)
CP53	66x66	276x13	-	17×10^6	37	(133)
LP22	67x67	200x11	-	?	?	(171)
PBC1	67x67	166x8	218x2.5	?	?	(105)
TB50	89x89	195x7	70x2	?	?	(105)
Øµ4	55x55	225x7	-	26×10^6	46	(172)
					57	(79)

Die Dimensionen von ØCL wurden aus der Abb. 26 bestimmt.

7.3. Die DNA des Phagen ØCL

Isolierte Phagen enthalten 26,4 % Nukleinsäure, wie sich aus dem Verhältnis der Extinktionen $OD_{280}/OD_{260} = 0.568$ für gereinigte Phagen ergibt. Diese Nukleinsäure läßt sich durch mehrfache Phenolextraktion (107) bzw. SDS-Behandlung (108) isolieren. Nach der DISCHE-Reaktion (109) handelt es sich um DNA und nach der Schmelzkurve um doppelsträngige DNA. Der in 1 x SSC (Meth) ermittelte Wendepunkt der Schmelzkurve liegt bei $83,3 \pm 0.4^\circ \text{C}$, die Hyperchromie beträgt 48 %. Nach der Gleichung $T_m = 69.3 + 0.41 (G+C)$ (110) läßt sich aus dem Schmelzpunkt ein (G+C)-Gehalt von 34.2 % errechnen. Dieser stimmt gut überein mit dem aus der Schwimmdichte $\rho = 1.695 \text{ g/cm}^3$ (in CsCl) errechneten Wert von 35.7 % (nach der Beziehung $\rho = 1.66 + 0.098 (G+C)$, (111)). Damit ergibt sich kein Anhaltspunkt, daß die ØCL-DNA ungewöhnliche Basen enthält. Eine chemische Analyse der Basenzusammensetzung wurde jedoch nicht durchgeführt.

Bedingt durch die Größe, ließ sich die ØCL-DNA nur unter sehr milden Bedingungen in einheitlicher Größe darstellen. Legt man die Präparationen von bester Einheitlichkeit in den Zentrifugationsschritten zugrunde, so beträgt die durch Bandenzentrifugation in einer analytischen Ultrazentrifuge ermittelte Sedimentationskonstante $s_{20,w} = 54 \pm 3$ Svedberg. Zu vergleichbaren Werten (53 ± 5 s) führten Sedimentationsanalysen in einer präparativen Ultrazentrifuge mit Ø μ 4-(79), T7-(112) und T5-DNA (113) als Eichwerten. Nach STUDIER (112) ergibt sich aus diesen Daten ein Molekulargewicht von etwa 100×10^6 . Aus entsprechenden Analysen unter alkalischen, denaturierenden Bedingungen folgt ein maximales Molekulargewicht zwischen 56 und 64×10^6 für Einzelstrang-DNA, was mit dem Wert für Doppelstrang-DNA gut korreliert. Das unter alkalischen Bedingungen erzeugte Sedimentationsprofil ließ auf statistische Einzelstrangbrüche schließen; ein Großteil der Stränge (> 50 %) wies keine Brüche auf.

Eine Auftrennung der DNA in zwei Einzelstränge durch Zentrifugation gelang bisher nicht, auch nicht in Gegenwart von poly (UG), eine Methode, die bei *B.cereus*T-DNA zum Erfolg führte (siehe Abb. 23).

7.4. In vitro-Transkription von ØCL-DNA

Doppelsträngige ØCL-DNA ist eine ausgezeichnete Matrice für die Transkriptase von *B.cereus*T (diese Arbeit), *B.stearothermophilus* NU 10 (Anhang II), *L.curvatus* (70) und *E.coli*; hitzedenaturierte, einzelsträngige DNA ist jeweils um einen Faktor 8-12 weniger effektiv. Bei hohen Ionenstärken im Standardansatz (z.B. 20 mM MgCl₂, 200-300 mM KCl) wird doppelsträngige ØCL-DNA besonders gut abgelesen. Dies wurde bereits für die RNA-Polymerase aus *B.cereus*T in Abb. 10 gezeigt; aus Abb. 27 ist ersichtlich, daß dies auch für das entsprechende Enzym aus *B.stearothermophilus* zutrifft. Mit dem Enzym aus *E.coli* wurden

an ϕ CL-DNA ähnliche Ergebnisse erzielt (114). Bei dem Enzym aus *B.stearothermophilus* fällt auf, daß die Erhöhung der Aktivität an ϕ CL-DNA durch hohe Salzkonzentration außerdem temperaturabhängig verlief: während bei einer Synthesetemperatur von 37° C Zugabe von KCl nur zu einer geringfügigen Aktivitätserhöhung führte (Faktor 1.4), war bei 55° C - der optimalen Synthesetemperatur dieses Enzyms an ϕ CL-DNA - eine weit stärkere Stimulierung durch KCl-Zusatz zu beobachten (Faktor 3.4).

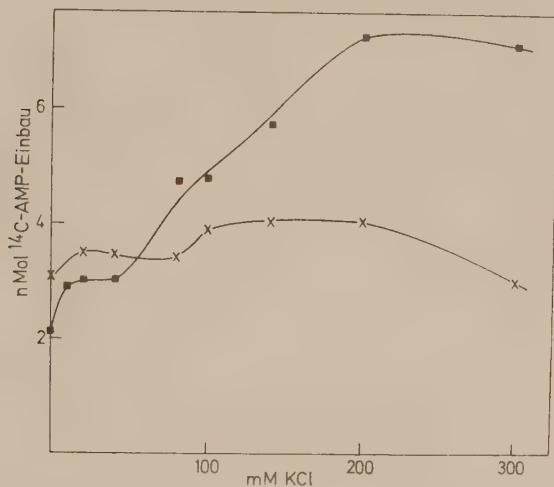


Abb. 27: RNA-Synthese an ϕ CL-DNA. Abhängigkeit von Ionenstärke und Temperatur

Je 2 μ g RNA-Polymerase aus *B.stearothermophilus* NU 10 wurden mit 40 μ g/ml ϕ CL-DNA im Standardansatz bei verschiedener KCl-Konzentration für 10 Minuten inkubiert. Die säureunlösliche Radioaktivität wurde wie beschrieben bestimmt (Meth.).
(■—■) Synthese bei 55° C; (x—x) Synthese bei 37° C.

Durch DNA-RNA-Hybridisierungsexperimente lässt sich überprüfen, ob sich die unter niedrigen Salzkonzentrationen (20 mM $MgCl_2$) synthetisierte RNA von der unter höheren Salzkonzentrationen (20 mM $MgCl_2$, 200 mM KCl) synthetisierten unterscheidet. Für eine solche Untersuchung wären getrennte Stränge der ØCL-DNA besonders gut geeignet, jedoch gelang ihre Isolierung nicht (s.oben). Aus diesem Grund mußte eine weniger Aussagen liefernde Hybridisierung an gesamter, alkali-denaturierter DNA durchgeführt werden (auf Filtern nach GILLESPIE und SPIEGELMAN (115)). Für erste Untersuchungen wurde die RNA gewählt, die unter der physiologisch angemesseneren Temperatur von 37° C an ds-ØCL-DNA mit der DNA-abh.RNA-Polymerase des ØCL-Wirtes *B.cereus* synthetisiert worden war. Wie aus der Abb. 28 hervorgeht, wurde mit sättigenden RNA-Mengen nur ein relativ geringer Teil der gesamten DNA hybridisiert. Bezogen auf den Einzelstrang, betrug dieser für "Niedersalz-RNA" 22.4 %, für "Hochsalz-RNA" 26.2 %. Beide Werte unterscheiden sich damit nur wenig. Zwar geht aus diesen Untersuchungen nicht hervor, ob beide RNA-Klassen identisch sind, jedoch erinnert dieses Verhalten an die Überschreibung von T7- und T5-DNA durch RNA-Polymerase aus *E.coli*, wo "Nieder"- und "Hochsalz-RNA" jeweils identisch sind und die höhere Nettosynthese bei "Hochsalz"-Bedingungen auf mehrmalige Überlesung der selben DNA-Bereiche zurückzuführen ist (116). Der relativ geringe Anteil, der von der RNA-Polymerase aus *B.cereus* an ØCL-DNA überschrieben wurde, erinnert ebenfalls an *E.coli*-Phagen wie T7 (117) oder T4 (118), oder den *B.subtilis* Phagen SP01 (119), wo in vitro nur die sogenannten "frühen Gene" der Phagen von dem Wirtsenzym abgelesen werden. Die Expression der "späten Gene" wird durch eine Phagen-kodierte σ (T7, (120)) oder durch den Phagen veränderte (T4, SP01 (118,119)) Transkriptase ermöglicht. Die Suche nach entsprechenden Ereignissen bei ØCL blieb bisher erfolglos. So unterschied sich die aus ØCL-infizierten *B.cereus*-Zellen isolierte Transkriptase von der aus uninfizierten Zellen isolierten bezüglich der Grundstruktur ($SS' \alpha_2$) und der Aktivität im Standardtest an ØCL-DNA nicht. Jedoch

kann nicht ausgeschlossen werden, daß zusätzliche Peptide, wie etwa bei *B. subtilis* nach SP01-Infektion -(119)- als neue Untereinheiten mitberücksichtigt werden müssen, die sich nicht in einfachen Enzymtests bemerkbar machen. Anhaltspunkte hierfür könnten einige Peptide sein, die nach Antikörper-Präzipitation der Transkriptase aus Rohextrakten zusammen mit diesem Enzym ausgefällt wurden und in entsprechenden Präparationen aus uninfizierten Zellen fehlen (Abb. 19).

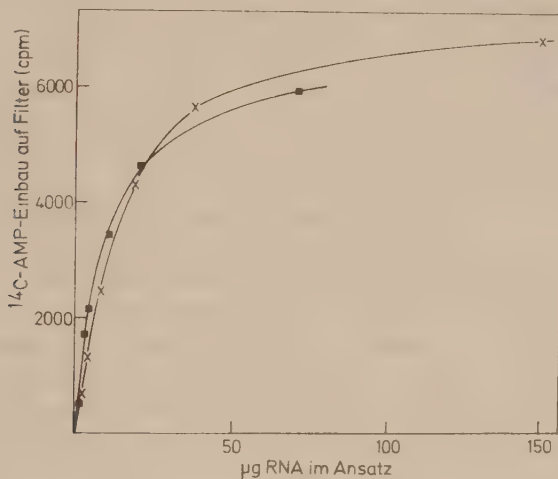


Abb. 28: Hybridisierung von in vitro synthetisierter RNA mit ØCL-DNA

Zwei zehnfache Standardansätze (48 µg/ml ØCL-DNA, 18 µg/ml RNA-Polymerase aus *B. cereus*T, ± 0.2 M KCl) wurden für 100 Minuten bei 37° C inkubiert und die synthetisierte RNA wie bei SCHÄFER beschrieben isoliert (164). Steigende Mengen isolierter RNA ((x——x): mit 0.2 M KCl im Ansatz synthetisiert, (■——■) ohne KCl im Ansatz synthetisiert) wurden nach (115) mit alkali-denaturierter ØCL-DNA in einem Gesamtvolumen von 2 ml hybridisiert (6.5 Std. bei 63° C). Je 32 µg DNA waren auf Membranfilter immobilisiert. Unter den Versuchsbedingungen entsprechen 2000 cpm 1.2 µg RNA. Ein Filterblindwert von 40 cpm ist bei allen Werten abgezogen.

7.5. Peptidmuster des Phagen ØCL

Zur weiteren Charakterisierung der ØCL-Phagen wurde das Muster der in hochgereinigten Phagen enthaltenen Peptidketten ermittelt. Dazu wurden die Phagen nach CsCl-Gleichgewichtsdichtegradientenzentrifugation gegen 1mM EDTA dialysiert, mit einem proteindenaturierenden Puffer (SDS, β -Merkaptoäthanol, Probenpuffer nach LÄMMLI (121), Meth) 3 min. gekocht, rasch abgekühlt und die Peptide nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS (Meth., log. Gradient) aufgetrennt. Nach der Anfärbung mit "Coomassie-Blau" überwiegen die drei Hauptpeptide No. 11, 13 und 17 sehr auffällig, während umgekehrt die Peptide No. 2, 3, 9, 15, 16 und 18 sehr dünn sind gemessen an den übrigen (eine quantitative Bestimmung wurde nicht durchgeführt) (Tab. 19). Die Molekulargewichte der Peptide 1-18 wurden unter Verwendung der Untereinheiten der DNA-abh. RNA-Polymerasen aus *E. coli* und *B. cereus* als Eichpeptiden bestimmt (s. Abb. 7). Sie sind in der Tab. 19 aufgeführt. Unter der Annahme, daß jedes Peptid nur einmal von der Phagen-DNA kodiert wird, muß man eine Kode-Kapazität für insgesamt 1.24×10^6 Daltons Protein fordern. Hierzu ist ein DNA-Strang von 11.2×10^6 Daltons, d.h. ca. 20 % der gesamten Einzelstrang-DNA des Phagens notwendig.

Tab. 19: Peptide des Phagen ØCL (← : Hauptpeptide)

Peptid No.	Molekulargewicht
1	200 000
2	185 000
3	180 000
4	140 000
5	105 000
6	84 000
7	82 000
8	54 000
9	30 000
10	28 000
11 ←	25 000
12	24 500
13 ←	21 000
14	20 000
15	17 000
16	16 000
17 ←	14 000
18	13 000

8. Der Sigma-Faktor der DNA-abh. RNA-Polymerase aus
B.stearothermophilus NU 10

Die DNA-abh. RNA-Polymerase eines weiteren Bacillusstammes, B.stearothermophilus NU 10, ist für in vitro-Untersuchungen besonders interessant, da das Temperaturoptimum ihrer Reaktion (50° , 71) sehr hoch liegt. Damit sind Voraussetzungen gegeben, den Mechanismus der Transkription auch relativ nahe dem Schmelzpunkt der eingesetzten Matrizen zu studieren. Während Eigenschaften des isolierten Enzyms beschrieben wurden und auch der Nachweis geführt werden konnte, daß mindestens drei Peptide β , β' und α Untereinheiten der RNA-Polymerase aus B.stearothermophilus darstellen (71,61,62), gelang es trotz intensiver Suche nicht, die Existenz eines σ -Faktors für B.stearothermophilus nachzuweisen (61,62).

Man könnte daher spekulieren, daß zur Initiation bei Temperaturen nahe dem Schmelzpunkt der DNA kein Sigmafaktor notwendig ist, so daß dieser deshalb fehlt. Wahrscheinlicher erscheint jedoch, daß auch bei *B.stearothermophilus* ein σ -Faktor existiert, jedoch mit den bisher verwendeten Methoden nicht dargestellt werden konnte.

Wie sich zeigt, läßt sich für diesen Organismus ein Sigmafaktor nachweisen, wenn die in dieser Arbeit vorgestellte Methode, DNA-abh.RNA-Polymerase aus *B.cereus* T zu isolieren, auch auf *B.stearothermophilus* NU 10 angewandt wird. Der folgende Teil befaßt sich mit der Charakterisierung des σ -Faktors aus *B.stearothermophilus*.

8.1. Isolierung und Struktur der DNA-abh.RNA-Polymerase aus *B.stearothermophilus* NU 10

Die RNA-Polymerase aus *B.stearothermophilus* NU 10 konnte genauso isoliert werden wie in Kapitel 1 für das entsprechende Enzym aus *B.cereus* T beschrieben; nach den "Polymix-Schritten" erwies sich Chromatographie an doppelsträngiger ϕ CL-DNA-Cellulose als wirksamster Reinigungsschritt (Abb. 29).

Durch nachfolgende Reinigung der Fraktionen mit RNA-Polymerase-Aktivität über einen Rohrzucker-Dichtegradienten (0.5 N NH_4Cl , Abb. 30) wurde ein hochaktives Enzym gewonnen, dessen spezifische Aktivität durch weitere Reinigungsschritte nicht erhöht werden konnte. Die Analyse der Fraktionen mit RNA-Polymerase-Aktivität durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von SDS (Abb. 31) zeigte die drei bekannten (61) Untereinheiten β , β' und α vom Molekulargewicht 140 000, 130 000 und 43 000 sowie das hier als σ beschriebene Peptid vom Molekulargewicht 52 000 mit einer Stöchiometrie von $\beta:\beta':\alpha:\sigma$ wie 1:1:2:(0.7-1) (Unter der Annahme gleichspezifischer Anfärbbarkeit der Untereinheiten ermittelt).

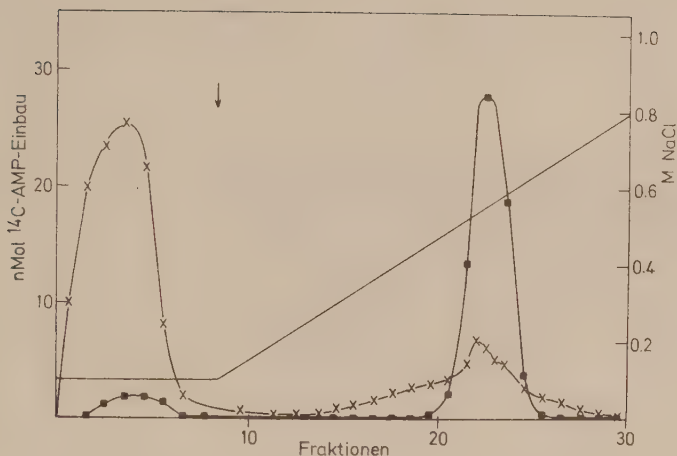


Abb. 29: Affinitätschromatographie der RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* NU 10

RNA-Polymerase aus 40 g Zellen von *B. stearothermophilus* NU 10 wurde wie bei *B. cereus*T beschrieben isoliert. Fraktion I, in 40 ml TEMEG-Puffer + 0.1 M NaCl aufgenommen, wurde auf eine ds-ØCl-DNA-Cellulosesäule (2x5 cm) gegeben (Fließgeschwindigkeit 12 ml/Stunde). Mit gleichem Puffer wurde gewaschen, dann ein linearer Gradient von NaCl in TEMEG-Puffer angelegt (200 ml, 0.1-1.2 M NaCl) Fraktionen a 5.8 ml wurden gesammelt und die Proteinkonzentration als optische Dichte bei 280 nm registriert (x—x). Fraktionen 31 und folgende enthielten kein Protein. Die RNA-Polymerase-Aktivität der Fraktionen wurde mit 50 µl-Aliquots an ØCL-DNA₈ im Standardansatz bestimmt (■—■) (10 Minuten bei 50° C).

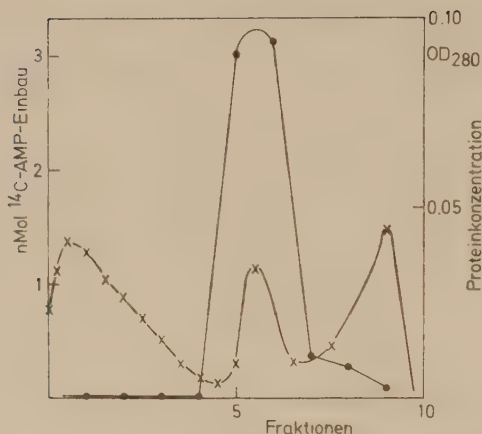


Abb. 30: Dichtegradientenzentrifugation von RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* NU 10

Die RNA-Polymerase-haltigen Fraktionen (21-25) der Abb. 29 wurden nach Konzentrierung durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung über einen Rohrzuckerdichtegradienten gereinigt (5 ml, 10-30 % Rohrzucker, 5-10 % Glycerin in TMA-Puffer + 0.5 M NH_4Cl). Nach Beendigung der Zentrifugation (15 Std., 50 000^upm, SW 50.1, Beckmann L5-Zentrifuge) wurde der Gradient kontinuierlich durch Unterschichten mit einer 55 %-igen Rohrzuckerlösung gezapft und die Extinktion der Proteine bei 280 nm über eine Durchflußküvette mit einem Gilford-Spektral-Photometer verfolgt (x—x). Fraktionen à 0.5 ml wurden gesammelt und je 10 µl zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität eingesetzt (●—●) (40 µg/ml ØCL-DNA, 10 Minuten Synthese bei 45° C).

Außerdem waren bei dieser Art der Enzymreinigung (nicht nach Affinitätschromatographie an Einzelstrang-DNA-Agarose, vergl. Abb. 4) zwei weitere Peptide vom Molekulargewicht 29 000 (P_{29}) bzw. 22 000 (P_{22}) zugegen. Inwieweit diesen Peptiden ein Einfluß auf die Transkription zukommt, ist bislang offen; ihre Abwesenheit wirkte sich nicht auf die spezifische Aktivität des Enzyms im üblichen Test aus.

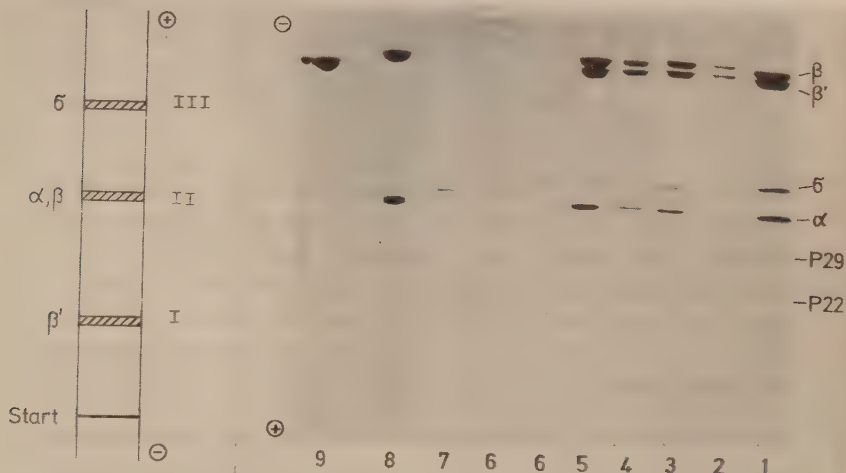


Abb. 31: SDS-Polyacrylamid(5-25 %)-Gelelektrophorese der DNA-abh. RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* NU 10

1: RNA-Polymerase aus *B. cereus* T; 2: RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* NU 10 (*B. st.*) nach Trennung an ϕ CL-DNA-Agarose (Meth. wie bei *B. cereus* T beschrieben); 3: RNA-Polymerase-*B. st.* nach Reinigung durch Dichtegradienten-Zentrifugation (s. Abb. 30); 4: *B. st.* Minimalenzym (Abb. 33); 5: *B. st.* Vollenzym (Abb. 33); 7: σ -Fraktion (Abb. 33); 6, 8, 9: Fraktionen der Cellogel-Elektrophorese (Abb. 32), 6: σ , 8: $\beta\alpha_2$, 9: β' .

Abb. 32: Auftrennung der RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* NU 10 durch Cellogel-Elektrophorese
Trennung in harnstoffhaltigem Puffer (s. Methodenteil).

8.2. Auftrennung in Untereinheiten und Rekonstitution

Bei einer elektrophoretischen Trennung der DNA-abh. RNA-Polymerase in Gegenwart von 6 M Harnstoff nach HEIL und ZILLIG (60) wurden drei Proteinbanden erhalten (Abb. 32), die durch nachfolgende Elektrophorese auf Polyacrylamid-gel in Gegenwart von SDS als reines β' (I), reines σ (III) und eine Mischung aus β und α (II) identifiziert wurden (Abb. 31). β, β' und α zeigten damit die schon von ZECHEL unter ähnlichen Bedingungen beobachtete Auftrennung (61); β und α konnten auch nicht durch Veränderungen des Trennpuffers getrennt werden, so daß die Annahme eines festen Komplexes beider Untereinheiten naheliegt.

Zur Benennung der großen Untereinheiten siehe Anmerkung bei B.cereus, Kapitel 2. Ein Indiz, daß es sich bei der größten Untereinheit um " β " handelt, darf außerdem in der Bildung eines $\beta\alpha_2$ -Komplexes gesehen werden, da man auch bei E.coli-RNA-Polymerase einen $\beta\alpha_2$ -Komplex darstellen kann, dort allerdings durch Chromatographie an Phosphocellulose (66).

Aus den getrennten enzymatisch nicht aktiven Untereinheiten konnte die RNA-Polymerase-Aktivität wieder rekonstituiert werden. Dazu wurden die isolierten Untereinheiten (s.Meth.) getrennt gegen Rekonstitutionspuffer B über Nacht bei 0° C dialysiert und anschließend in gewünschter Kombination vereinigt. Wie aus der Tabelle 20 ersichtlich ist, lieferte die Kombination von β' und $\beta\alpha_2$ bereits eine deutliche Enzymaktivität an Phagen-DNA(ϕ CL), die um einen Faktor 6 erhöht werden konnte, wenn zusätzlich Faktor γ gegenwärtig war.

ZECHEL berichtete bereits über eine anders durchgeführte Rekonstitution der Enzymaktivität aus den getrennten Komponenten β' und $\beta\alpha_2$, jedoch konnte in diesen Experimenten die enzymatische Aktivität durch keines der außerdem zugegebenen Peptide erhöht werden (61,62).

Tab. 20: Rekonstitution der DNA-abh. RNA-Polymerase von
B. stearothermophilus NU 10 aus getrennten Unter-
einheiten

Je 15 μ l β' bzw. $\beta\alpha_2$ oder 10 μ l σ wurden nach Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer B (Meth.) in der angegebenen Weise gemischt und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Mischung zu vorgewärmtem Standardansatz gegeben und RNA-Synthese an 10 μ g ϕ CL-DNA für 20 Minuten erlaubt (50° C). Die Proteinkonzentrationen der isolierten Untereinheiten waren zu gering, um exakt bestimmt zu werden. Sie betrugen unter 0.1 mg/ml. Die Aktivität ist angegeben in cpm 14-C-AMP-Einbau.

Ansatz No.	Untereinheit im Ansatz			Aktivität (cpm)
	β'	$\beta\alpha_2$	σ	
1	-	-	+	0
2	-	+	-	0
3	+	-	-	0
4	+	+	-	376
5	+	+	+	2276

8.3. Darstellung eines Minimal-Enzymes und Einfluß von σ

Aus Enzym, das über DNA-Cellulose-Chromatographie gereinigt worden war und noch wenige zusätzliche Peptide enthielt, konnte über Phospho-Cellulose-Chromatographie - wie für B. cereusT beschrieben - ein Minimalenzym dargestellt werden (Abb. 31,33). Die Durchlauf-Fraktion enthielt zwei Peptide vom Molekulargewicht 47 000 bzw. 52 000, der Proteingipfel II in seinem vorderen Teil (zwischen 0.2 und 0.3 M KCl) β, β' und α und unterstöchiometrische Mengen σ , in seinem hinteren Teil (zwischen 0.30 und 0.38 M KCl) β, β' und α , jedoch nur Spuren von σ . Die Peptide P₂₂ und P₂₉ eluierten ebenfalls im vorderen Teil des Proteingipfels II. Im Proteingipfel III sind neben einem Peptid vom Molekulargewicht 92 000 vorwiegend kleinere Peptide enthalten, die als Verunreinigungen in DNA-Cellulose-gereinigtem Enzym vorhanden waren.

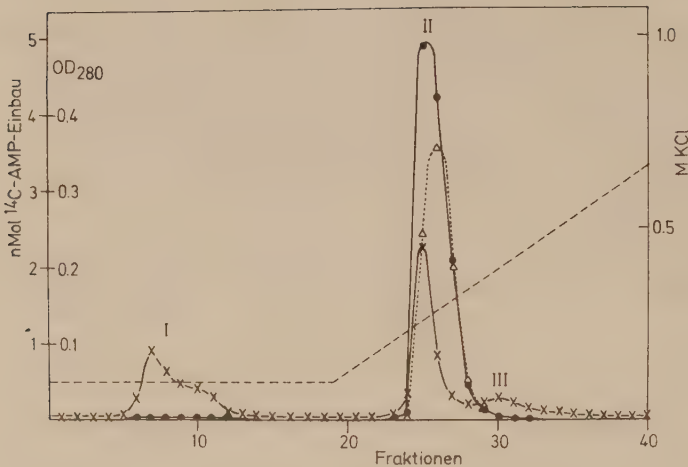


Abb. 33: Trennung der RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* NU 10 über eine Phospho-Cellulose-Säule

2 mg RNA-Polymerase (Fr. 21-25 der Abb. 29) wurden über eine Phospho-Cellulose-Säule gereinigt wie für *B. cereus*T-Enzym in der Legende der Abb. 15 beschrieben. 1 ml Fraktionen wurden gesammelt und je 10 μ l auf enzymatische Aktivität an ϕ CL-DNA ($\bullet$ — $\bullet$) oder polyd(AT) (Δ — Δ) getestet (Standardansätze, 10 Minuten Synthese bei 50°C). Die Proteinkonzentration ist als OD₂₈₀ gegeben ($\times$ — $\times$). (-----): KCl-Konzentration im Elutionspuffer.

Mißt man an Phagen-DNA bzw. an Polyd(AT) die enzymatische Aktivität der Fraktionen, die β , β' , α sowie unterschiedliche Mengen an Peptid vom MG 52 000 ($=\sigma$) enthalten, zeigt sich, daß mit abnehmendem σ -Gehalt auch die relative Aktivität an Phagen DNA abnimmt (Abb. 33). Die Fraktionen mit β , β' und α verhielten sich also wie das Minimal-Enzym von *B. cereus*T. Zusatz von Durchlauf-Fraktion erhöhte diese Aktivität an Phagen-DNA bereits in kleinen Mengen beträchtlich.

Es muß bemerkt werden, daß die Durchlauf-Fraktion außer σ relativ hohe Mengen an Peptid vom MG 47 000 enthielt. Dieses Peptid ist kein Bestandteil der DNA-abh. RNA-Polymerase, da es durch Dichtegradienten-Zentrifugation ohne Hinderung der Aktivität von ihr abgetrennt werden konnte. Reiner σ -Faktor (Abb. 31, 32), elektrophoretisch gewonnen wie oben ausgeführt, stimulierte das Minimal-Enzym an ϕ CL-DNA maximal um den Faktor 13, an ϕ μ 4-DNA um den Faktor 5 (Abb. 34). Die Stimulierung zeigte die für andere σ -Faktoren - z.B. *B. cereus* (Abb. 17, 18) oder *E. coli* (54) - typische Mengenabhängigkeit; der σ -Faktor alleine wies keinerlei Eigenaktivität im Einbautest auf.

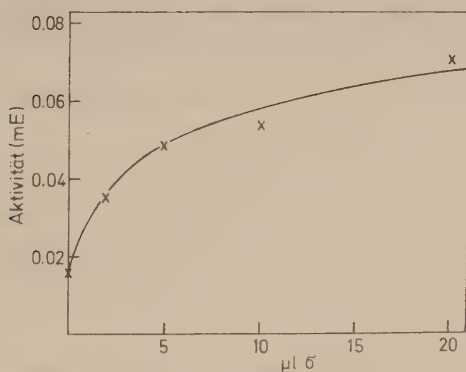


Abb. 34: Stimulierung der Minimalenzymaktivität von *B. stearothermophilus* durch den homologen σ -Faktor

10 μl Minimalenzym (Fr. 28 der Abb. 33) wurden im Standardansatz in Gegenwart steigender Mengen σ (elektrophoretisch gereinigt, Abb. 32) für 10 Minuten bei 50° C inkubiert. Matriz: 130 $\mu\text{g/ml}$ ϕ μ 4-DNA.

Während durch diese Versuche erstmals nachgewiesen wurde, daß die DNA-abh. RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* aus einer "Vollenzym"-Form in ein "Minimal-Enzym" und einen σ -Faktor vom Molekulargewicht 52 000 aufgespalten und wieder zusammengesetzt werden kann, beschrieben AIR und HARRIS in einer Arbeit über die RNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ebenfalls die Struktur der DNA-abh. RNA-Polymerase aus *B. stearothermophilus* (122). Diese Autoren zeigen eine Trennung dieses Enzyms auf einem SDS-Polyacrylamidgel. Eine Proteinbande vom Molekulargewicht 95 000, die in diesem Gel an einer dem *E. coli*- σ -Faktor vergleichbaren Stelle auftritt, bezeichnen sie als den σ -Faktor aus *B. stearothermophilus*. Eine Trennung des Enzyms in Minimalenzym und den σ -Faktor wurde nicht beschrieben. Es wurde auch kein anderer Nachweis geführt, daß es sich bei diesem Peptid von 95 000 Daltons um den *B. stearothermophilus*- σ -Faktor handelt. Ein Peptid von vergleichbarer Größe - 92 000 Daltons - wurde auch von mir als Begleitpeptid der RNA-Polymerase gefunden, ohne daß ihm allerdings eine Funktion, z.B. Stimulierung des Minimalenzym, zugeordnet werden konnte. Andererseits enthielt die von AIR und HARRIS isolierte RNA-Polymerase zahlreiche weitere Peptide, u.a. auch solche, deren Größe dem hier als σ nachgewiesenen Peptid vom Molekulargewicht 52000 ähneln.

8.3.1. Überkreuzstimulierung von Minimalenzym und σ -Faktoren verschiedener Organismen

In Tab. 9, Kap. 4 war bereits gezeigt worden, daß $\sigma_{B.st.}$ auch das Minimalenzym aus *B. cereus* T bei 37° C zu stimulieren vermag. Das entsprechende Minimalenzym aus *E. coli* konnte dagegen unter ähnlichen Bedingungen nicht stimuliert werden (Tab. 21).

Umgekehrt wurde *B. stearothermophilus*-Minimalenzym durch $\sigma_{E.c.}$ bei 37° C zwar wenig, jedoch signifikant (Faktor 2.1) stimuliert; unter dieser für *B. stearothermophilus*-Enzym erheblich vom Optimum entfernten Synthesetemperatur (71) war die Stimulierung durch den eigenen σ -Faktor nur 5-fach gegenüber 8-fach bei der optimalen Temperatur von 55° C (Tab. 21). Das Minimalenzym aus *B. stearothermophilus* ließ sich außerdem durch den σ -Faktor der RNA-Polymerase aus *L. casei*, eines Mn^{++} - statt Mg^{++} - abhängigen Enzyms (57), selbst unter Bedingungen stimulieren (20 mM Mg^{++} , 37° C), die weit entfernt waren vom Reaktionsoptimum bei der Reaktionspartner (Tab. 21).

Diese Versuche deuten darauf hin, daß eine σ -abhängige Reaktion bei *B.stearothermophilus*-RNA-Polymerase bei 37° C abläuft, einer Temperatur, die leicht über dem erwarteten Wendepunkt (71) in der temperaturabhängigen Initiationskomplex-Bildung (62) liegt. Die positive Überkreuzstimulierung ermutigt zu weitergehenden "intergenerischen" Kombinationen (123) - z.B. Austausch von weiteren Untereinheiten über Rekonstitution (60) - in der Hoffnung, dabei Informationen über die Funktionen einzelner Untereinheiten zu erlangen.

Tab. 21: Überkreuzaktivierung von Minimalenzymen und σ -Faktoren verschiedener Organismen

Minimalenzym aus *B.stearothermophilus* (10 μ l Fr. 28, Abb. 33), *E. coli* (8 μ g) und *L.casei* (3 μ g) wurden in An- bzw. Abwesenheit der σ -Fraktion aus *B.stearothermophilus* (elektrophoretisch, Abb. 32), *E.coli* (Phosphocellulose-gereinigt) und *L.casei* (elektrophoretisch) bei der angegebenen Temperatur im Standardansatz inkubiert (ϕ CL-DNA). *L.casei*-Minimalenzym allein zeigte unter den Testbedingungen keine Aktivität. Angabe der Aktivität in cpm 14-C-AMP-Einbau in säureunlösliches radioaktives Material.

Quelle	σ Menge (μ l)	Temperatur (°C)	Aktivität (cpm) Minimalenzym aus		
			<i>B.stearo.</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.casei</i>
-	-	50	287	-	-
<i>B.stearo.</i>	5	50	2247	-	-
<i>B.stearo.</i>	10	50	3778	-	-
-	-	37	318	804	0
<i>B.stearo.</i>	5	37	1628	951	60
<i>E.coli</i>	2	37	661	2733	-
<i>L.casei</i>	1	37	1330	-	278

Konzentrationen der σ -Faktoren: *B.stearothermophilus* unter 0.1 mg/ml, *E.coli* ca. 0.2 mg/ml, *L.casei* ca. 0.3 mg/ml.

8.4. Heparin und B.stearothermophilus-RNA-Polymerase

Nach ZECHEL inhibierte Heparin DNA-abh. RNA-Polymerase aus B.stearothermophilus unabhängig davon, ob es 1) sofort oder 2) erst nach Vorinkubation von RNA-Polymerase mit DNA zur Bildung eines "Präinitiationskomplexes" zum Reaktionsansatz gegeben wurde. Es blieb jedoch unklar, ob die im Vergleich zum E.coli-System unerwartete totale Hemmung unter Bedingung 2) darauf zurückzuführen war, daß der damals unbekannte σ -Faktor im Testansatz fehlte und/oder daß an den nicht homologen DNAs der Phagen T4 bzw. SP50 keine spezifische Wechselwirkung stattfand oder daß bei diesem Enzym ein "Präinitiationskomplex" prinzipiell nicht "heparinstabil" ist (62).

Um diese Frage zu entscheiden, wurden mit dem hier isolierten, σ -haltigen Enzym und der homologen DNA des B.stearothermophilus-Phagen $\phi\mu 4$ (79) Versuche nach ZECHEL (62) durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich, daß auch die Verwendung einer homologen Matrize und die Gegenwart von σ -Faktor bei der Präinkubation von DNA und Enzym keinen Schutz vor der Heparin-Inaktivierung zu bewirken vermag (Tab. 22). Unabhängig davon, ob Enzym und DNA überhaupt nicht, 5 oder 10 Minuten bei 50° C vorinkubiert wurden, ob der Zerfall des "Präinitiationskomplexes" in Gegenwart von Heparin nur kurzfristig (1 Minute) oder länger (5 Minuten) zugelassen wurde, war die Restaktivität sehr niedrig. Sie betrug weniger als 0.5 % des entsprechenden ungehemmten Reaktionsansatzes. Auch bei sehr niedrigen Heparinkonzentrationen konnte durch Vorinkubation kein Schutz vor der Heparinwirkung beobachtet werden. Auch durch Präinkubation bei 37° C statt 50° C und durch Verwendung von ϕ CL-DNA statt $\phi\mu 4$ -DNA änderte sich dieses negative Ergebnis nicht.

Geht man davon aus, daß unter den Bedingungen der Vorinkubationen jeweils ein "Präinitiationskomplex" (80,81) gebildet wurde, wofür andere, hier nicht aufgeführte eigene Arbeiten nach BORDIER (124) sprechen, so muß man schließen, daß er nicht "heparinstabil" ist.

Tab. 22: Heparin und DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.stearothermophilus NU 10

Ansätze 3-6: Je 32 µg Øµ4-DNA wurden mit 5 µg Vollenzym aus B.stearothermophilus NU 10 und Tris-HCl-Puffer (0.03 M Tris-Cl, 0.008 M Mg(CH₃COO)₂, 0.05 M KCl, pH 8.3) in einem Gesamtvolumen von 100 µl für die angegebene Zeit bei 50° C vorinkubiert (Phase I). Danach wurde 50 µg Heparin in 25 µl Tris-Cl-Puffer (vorgewärmt auf 50° C) bzw. nur Tris-Cl-Puffer (Salz) zugegeben und für die angegebene Zeit weiterinkubiert (Phase II). Anschließend wurden 125 µl Substratmischung (0.5 mM GTP, CTP, UTP, 14-C-ATP in Tris-Cl-Puffer) zugegeben und RNA-Synthese für 10 Minuten bei 50° C erlaubt (Phase III). Bei den Ansätzen 1 und 2 keine Phasen I und II; hier wurden alle Komponenten bei 0° C gemischt und Synthese für 10 Min. bei 50° C erlaubt. Bestimmungen der säureunlöslichen Radioaktivität wie beschrieben. Aktivitätsangabe in nMol-14-C-AMP-Einbau.

No.	Phase I (Min)	Phase II		Zeit (Min)	Phase III Aktivität	
		Salz	Heparin		nMol	%
1	-	+	-	-	19.360	100
2	-	-	+	-	0.068	0.35
3	10	+	-	1	18.150	100
4	10	-	+	1	0.074	0.41
5	5	-	+	1	0.087	0.48
6	5	-	+	5	0.071	0.39

Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse

I. Isolierung, Struktur, Eigenschaften der DNA-abh. RNA-Polymerase aus B.cereusT

1. Zusatz von "PolymyxinP" zu aufgeschlossenen Zellen und stufenweise Elution des resultierenden Niederschlags mit steigender Salzkonzentration führt zu einer Grobanreicherung der Transkriptase aus vegetativen und sporulierenden Zellen von B.cereusT. Das Verfahren eignet sich ebenfalls für B.stearothermophilus NU 10 (veg. Zellen, s. Anhang)
2. Zur weiteren Reinigung aus vegetativen Zellen sind zwei Verfahren geeignet: a) Zentrifugation über einen Rohrzuckerdichtegradienten, b) Chromatographie an immobilisierter DNA, bes. an ss- ϕ CL-DNA-Agarose. Aktives Enzym aus sporulierenden Zellen konnte nur über Verfahren b) gewonnen werden.
3. Aktives Enzym aus sporulierenden Zellen kann nur dann gewonnen werden, wenn die verwendeten Puffer hohe EDTA (50 mM)- und PMSF (10^{-3} M)-Konzentrationen und keine Mg^{++} -Ionen enthalten.
4. Strukturbestandteile und damit Untereinheiten sind die vier Peptide β, β', σ und α ; ihre Molekulargewichte betragen 140 000, 130 000, 56 000 bzw. 43 000. Die stöchiometrische Zusammensetzung steht im Einklang mit der Formel $(\beta'\beta\alpha_2)\sigma$.
Trennung der Untereinheiten nach Ladungsdichte führt zur Aufspaltung in drei Fraktionen β', β und $(\alpha\sigma)$. Die zweitgrößte Untereinheit β' ist hiernach die basischste. Menge, Größe und Ladungsdichte der vier Untereinheiten sind bei Enzymen, die aus vegetativen oder sporulierenden Zellen isoliert wurden, identisch.
5. Optimale RNA-Synthese erfolgt bei einer Temperatur von 37° C, einem pH-Wert von 8.3 und 20 mM Mg^{++} -Ionen, wenn verschiedene Matrizen getestet werden sollen. Die optimale Salzkonzentration für die Reaktion ist von der

Art der vorgelegten Matrize abhängig. Für ϕ CL-DNA ist sie 0,2-0,3 M KCl.

6. Die Matrizenspezifität der DNA-abh. RNA-Polymerase aus vegetativen und sporulierenden Zellen weist keinen signifikanten Unterschied auf. ϕ CL-DNA ist jeweils die wirksamste Matrize, Polyd (AT) 4-5 mal weniger effektiv.
7. Das an Phagen-DNA vollaktive Enzym $(\beta'\beta\ \alpha_2)\sigma$ aus vegetativen und sporulierenden Zellen kann über Chromatographie an Phosphocellulose in ein Minimalenzym $(\beta'\beta\ \alpha_2)$ und den σ -Faktor zerlegt werden. Aktives σ kann präparativ außerdem elektrophoretisch als $(\alpha\sigma)$ -Fraktion gewonnen werden. Minimal- und Vollenzym sind an Polyd(AT) gleich aktiv, während Minimalenzym an Phagen-DNA unter den Versuchsbedingungen bis zu 13 mal weniger aktiv ist. Kombination mit σ führt zur Wiederherstellung der Vollenzymeigenschaft. Minimalenzym und σ aus vegetativen und sporulierenden Zellen können dabei beliebig kombiniert werden.
8. In isoliertem Vollenzym ist σ katalytisch aktiv. Seine Fähigkeit, Minimalenzym zu stimulieren, ist nicht beeinträchtigt durch mitgereinigte, stadienspezifische Peptide (kein Anti- σ -Faktor).

II. Transkriptaseaktivität in Rohextrakten

1. Immunpräzipitate, die durch Inkubation von Rohextrakten mit einem Anti-RNA-Polymerase-Serum erzeugt wurden, enthalten β und β' in einem 1:1-Verhältnis. Es spielt dabei keine Rolle, ob die Rohextrakte aus vegetativen oder sporulierenden Zellen stammen.
2. Nur sporulierende Zellen enthalten drei Peptide vom Molekulargewicht 17 000 (ab $t_{1.5}$), 38 000 und 40 000 (ab t_3); diese binden etwas stärker an Einzelstrang-DNA-Agarose als die DNA-abh. RNA-Polymerase, werden aber zum Teil mit dieser eluiert. Sie beeinflussen die Transkriptaseaktivität nicht oder in nicht bekannter Weise.

3. Größe und Anzahl der an Doppelstrang-DNA-Cellulose bindenden Peptide unterscheiden sich in vegetativen und sporulierenden Zellen.
4. Bei Kurzzeitsynthese (5-10 Min.) ist die Matrizenspezifität der Transkriptase in Rohextrakten aus vegetativen und sporulierenden Zellen nicht signifikant verschieden. ØCL-DNA ist eine 4 bis 5 mal effektivere Matrize als polyd(AT).
5. Bei Langzeitsynthese (mehr als 10 Min.) täuscht die Anwesenheit einer Protease in Rohextrakten aus sporulierenden Wildtyp-Zellen eine Änderung der Matrizenspezifität vor. Die Nettosynthese an ØCL-DNA erscheint unter solchen Bedingungen stark herabgesetzt und ist größenordnungsmäßig mit derjenigen an polyd(AT) zu vergleichen.
6. Die angereicherte Protease spaltet in Abwesenheit von DNA, jedoch sonst unter Transkriptions-Bedingungen die DNA-abh. RNA-Polymerase bevorzugt an den Untereinheiten σ , β und β' .
7. Aus Untersuchungen der Transkriptaseaktivität in Rohextrakten der proteasearmen, normal sporulierenden Mutante B.cereusTC an doppel-strängigen Phagen-DNAs geht hervor: die Matrizenspezifität der DNA-abh. RNA-Polymerase ist in vegetativen und sporulierenden Zellen an diesen Matrizen nicht signifikant verschieden. Die Aktivität an Einzelstrang-DNA ist in sporulierenden Zellen höher als in vegetativen Zellen. Es gibt keinen Hinweis auf einen "Anti- σ -Faktor".
8. RNA, die in vitro an B.cereusT-ds-DNA mit Rohextrakten aus vegetativen oder sporulierenden Zellen des Wildstammes synthetisiert wurde, hybridisiert bevorzugt mit dem H-Strang der B.cereusT-DNA. Sie wird in gleichem Ausmaß von in vivo synthetisierter vegetativer oder t_3 -RNA kompetiert.

III. Der Phage Ø C L

1. Der B.cereusT-Phage ØCL ist mit keinem der bisher beschriebenen B.cereusT-Phagen identisch. Er enthält 18 verschiedene Peptide. Die Summe ihrer Molekulargewichte ist 1.24×10^6 . Dies erfordert eine Kodekapazität von 11×10^6 Daltons auf der DNA.
2. Die Nukleinsäure des Phagen ist eine doppelsträngige DNA. Ihr Schmelzpunkt beträgt 83.3°C ; der GC-Gehalt wurde zu 35 % bestimmt. Als Molekulargewicht ergibt sich etwa 100×10^6 .
3. Native ØCL-DNA ist bei hoher Ionenstärke eine ausgezeichnete Matrize für die Vollenzyme aus B.cereusT und B.stearothermophilus NU 10. Denaturierte, einzelsträngige DNA wird 10 x weniger effizient abgelesen. Die DNA-abh. RNA-Polymerase aus B.cereusT liest bis zu 26 % der Kodekapazität der ØCL-DNA ab.

IV. Der σ -Faktor von B.stearothermophilus NU 10

1. Die für B.cereusT beschriebenen Methoden führen auch bei B.stearothermophilus NU 10 zur Darstellung eines Vollenzyms ($\beta'\beta\alpha_2$) σ und zur Abtrennung eines σ -Faktors von Minimalenzym ($\beta'\beta\alpha_2$).
2. Der bisher unbekannte σ -Faktor aus B.stearothermophilus hat ein Molekulargewicht von 52 000 und ist die sauerste Enzymuntereinheit.
3. Vollenzym ($\beta'\beta\alpha_2$) σ wird auch nach Vorinkubation mit der homologen DNA des B.stearothermophilus-Phagen Ø μ 4 durch Heparin vollständig gehemmt.

DISKUSSION

I. Isolierung, Struktur und Eigenschaft der DNA-abh. RNA-Polymerase aus *B. cereus* T

Die DNA-abh. RNA-Polymerase aus *B. cereus* T läßt sich aus allen Wachstumsphasen und Sporulationsstadien mit einem Verfahren gewinnen, das in dieser Art bislang auf sporulierende Organismen nicht angewendet wurde: in den ersten Schritten wird die Eigenschaft der RNA-Polymerase ausgenützt, zusammen mit anderen Proteinen und Nukleinsäuren in Gegenwart des Polykations "Polymin P" ein nur bei hoher Ionenstärke dissoziierendes Präzipitat zu bilden. Diese "PolyminP-Methode", erstmals in etwas anderer Form bei dem analogen Enzym aus *E. coli* beschrieben (52), scheint mit geringer Variation allgemein anwendbar zu sein für die Grobanreicherung von prokaryontischer DNA-abh. RNA-Polymerase, wie Ergebnisse an *E. coli* (62), *B. cereus* T und *B. stearothermophilus* NU 10 (diese Arbeit) oder *L. curvatus* (70) und *L. casei* (57) nahelegen. In jüngster Zeit wurde auch eine erfolgreiche Anwendung bei eukaryontischen Zellen beschrieben (125). Der entscheidende Vorteil dürfte mindestens bei *B. cereus* vor allem darin liegen, daß das Enzym in dieser gebundenen Phase vor proteolytischer Inaktivierung geschützt wird. Für die Schlußreinigung eignet sich am besten Affinitätschromatographie an Einzelstrang-DNA-Agarose (59), wenn hohe Reinheit, an Doppelstrang-DNA-Cellulose (58), wenn höhere Ausbeute vorrangig ist.

Bis zur Homogenität gereinigtes Enzym besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten und hat die Bruttoformel $(\beta'\beta\alpha_2)\sigma$. Es gleicht damit den meisten bisher beschriebenen DNA-abh. RNA-Polymerasen aus Prokaryonten (37, 53, 54, 70, 122, 126, 127-132).

Die β' -Untereinheit - hier als die Untereinheit mit der größten positiven Ladungsdichte definiert (70) - ist wie bei *B. stearothermophilus* (61), *L. curvatus* (70) oder *L. casei* (57) und im Gegensatz zu *E. coli* kleiner als die β -Untereinheit. Die Größe des σ -Faktors ist derjenigen anderer *Bacillus*-Stämme ähnlich (37, 53, 126, 127, 131).

Die Art der Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von verschiedenen Parametern (z.B. DNA, Nukleosidtriphosphate, Mg^{++}) sowie die Hemmung der Reaktion durch das Antibiotikum

Rifampicin (73) sind typisch für die bislang beschriebenen DNA-abh. RNA-Polymerasen aus Prokaryonten.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Ionenstärke ist zum Großteil bestimmt von der Art der eingesetzten Matrize und weniger eine Grundeigenschaft des Enzyms; Enzyme aus *E. coli*, *L. curvatus* oder *B. stearothermophilus* unterliegen an den hier verwendeten Matrizen einem vergleichbaren Einfluß der Ionenstärke (114,70). Zur Ableitung von Einzelstrang-DNA und synthetischem Polyd(AT) genügt ein Enzym, das nur die drei Untereinheiten β , β' und α enthält, während optimale Transkription von Doppelstrang-DNA außerdem die Gegenwart des σ -Faktors voraussetzt.

Dies ist im Einklang mit Befunden an *E. coli*-RNA-Polymerase, nach denen man ein Minimalenzym ($\beta'\beta\alpha_2$) mit unspezifischer Aktivität ("symmetrische Transkription") von einem hochspezifischen Vollenzym ($\beta'\beta\alpha_2\sigma$) ("asymmetrische Transkription") unterscheidet. Der spezifische Komplex aus Vollenzym und DNA zeigt dort erhöhte Stabilität gegen hohe Salzkonzentration (135). Dieser "stabile Präinitiationskomplex" wird nur an den sogenannten Promotoren gebildet.

Bei *E. coli*-RNA-Polymerase kann man mit Hilfe des Transkriptioneninhibitors Heparin "Präinitiationskomplexe" von Enzym-DNA-Komplexen an unspezifischen DNA-Bindungsstellen unterscheiden: durch Inkubation von Vollenzym und DNA gebildete "Präinitiationskomplexe" sind vor der Heparininhibition geschützt, d.h. sie zerfallen bei Heparineinwirkung langsam (Halbwertszeiten viele Stunden), sind also "stabil", unspezifische Enzym-DNA-Komplexe zerfallen in Gegenwart von Heparin sehr rasch (Halbwertszeiten wenige Sekunden) (62,81).

In ähnlichen Versuchen gelang es hier nicht, *B. cereus*-T-Vollenzym in einen gegen die Heparinwirkung geschützten, stabilen "Präinitiationskomplex" zu überführen. Da man weiß, daß hierzu im Fall der *E. coli*-RNA-Polymerase die Gegenwart des Initiationsfaktors σ absolut notwendig ist (62), könnte man glauben, daß hier als der *B. cereus*-T- σ -

Faktor bezeichnete Peptid vom Molekulargewicht 56 000 sei kein dem E.coli- σ vergleichbarer Initiationsfaktor. In Wirklichkeit aber zeigte sich eine direkte Analogie zwischen beiden σ -Faktoren: der σ -Faktor aus B.cereusT beeinflusst in gleicher Weise wie der σ -Faktor aus E.coli die Aktivität von E.coli-Minimalenzym; er ist außerdem wie der E.coli σ -Faktor in der Lage, E.coli-Minimalenzym in einen gegen Heparin geschützten stabilen Präinitiationskomplex zu überführen. Umgekehrt führt E.coli- σ -Faktor ebenso wenig wie der B.cereusT- σ -Faktor bei Inkubation mit Minimalenzym aus B.cereusT und ds-DNA zu einem "heparinstabilen" Komplex (134).

Damit liegen gleiche Verhältnisse vor wie bei L.curvatus, wo eindeutig gezeigt wurde, daß das Ausbleiben eines "heparinstabilen Präinitiationskomplexes" von der Art des Minimalenzyms und nicht von der Art des σ -Faktors abhängt (70). Vollenzym aus B.stearothermophilus kann ebenfalls nicht in einen vor Heparin geschützten "Präinitiationskomplex" überführt werden (61 und Tab. 22).

Aus solchen Ergebnissen kann man folgern, daß in "Präinitiationskomplexen" aus DNA und den RNA-Polymerasen aus B.cereusT, B.stearothermophilus, L.casei oder L.curvatus, anders als bei dem Komplex mit E.coli-Enzym, eine Heparinangriffsfläche am Enzym ungeschützt vorliegt, was zu einem raschen Zerfall bei Heparineinwirkung führt.

Während das hier beschriebene Enzym aus B.cereusT in Aktivität und Struktur von Minimal- und Vollenzym gut vergleichbar ist mit analogen Enzymen aus nahe verwandten Bacillusarten (37, 53, 126, 127, 136, 137), wurde während den Untersuchungen an dieser Arbeit von COHEN et al. ebenfalls eine DNA-abh. RNA-Polymerase aus B.cereusT beschrieben (138, 139); diese soll eine für Prokaryonten äußerst ungewöhnliche Zusammensetzung - Ausnahme H.cutirubrum (140) - aus nur zwei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 140 000 und 29 000 zeigen.

Die größere allein soll Minimalenzym-Aktivität besitzen, die kleinere der B.cereusT- σ -Faktor sein (138). Transkriptaseaktivität nur einer einzigen Peptidkette ist bislang jedoch nur für mitochondriale Transkriptase (141) bzw. Phagen-kodierte RNA- Polymerasen (120,142) gesichert. In der vorliegenden Arbeit zeigte eine einzige Untereinheit allein - z.B. die ähnlich großen β - oder β' -Untereinheiten - in keinem Fall enzymatische Aktivität. Die von COHEN et al. beschriebene Aktivität könnte jedoch auf nicht vollständig entfernte restliche Untereinheiten zurückzuführen sein. Ähnliche Minimal-Aktivität wird auch bei nicht vollständig getrennten Untereinheiten aus E.coli beobachtet (114). Ob dem Peptid vom Molekulargewicht 29 000 unter solchen Voraussetzungen eine σ -Funktion zugesprochen werden darf, ist sehr fraglich. Ein Peptid von ähnlicher Größenordnung (32-34 000 Daltons) wurde im Laufe dieser Arbeit ebenfalls beobachtet, ohne daß ihm allerdings eine Funktion zugeordnet werden konnte. Auffallenderweise wurden auch bei B.stearothermophilus (diese Arbeit) und B.subtilis (86,87) Peptide ähnlicher Größe gefunden. Bisher fehlen aber eindeutige Ergebnisse, die es erlauben, sie als zusätzliche Untereinheiten der DNA-abh.RNA-Polymerase anzusprechen. Eine volle Bestätigung der hier beschriebenen Struktur der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.cereusT wurde nach Abschluß der hier durchgeführten Arbeiten von HATTORI et al. veröffentlicht (143).

II. Änderung der Struktur der DNA-abh.RNA-Polymerase während der Sporulation?

Zu Beginn dieser Arbeit war die nach Befunden von LOSICK und Mitarbeitern entwickelte Hypothese unumstritten, eine Strukturänderung der DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.subtilis - Modifikation einer großen Enzym-Untereinheit, Verlust von σ bzw. dessen Aktivität - sei eine notwendige Voraussetzung für die Transkription von Sporengenen in vivo (36-41, 45).

Während der hier durchgeführten Arbeiten an *B.cereus* berichteten KLIETZ et al. außerdem über ähnliche Strukturänderungen der DNA-abh. RNA-Polymerase während der Sporulation von *B.thuringiensis*. Sie beschrieben darüber hinaus weitere strukturelle Modifikationen, die auch die kleinen Untereinheiten (σ und α) betrafen (126, 144). Man glaubte außerdem, die Modifikationen der RNA-Polymerase aus *B.subtilis* durch Untersuchungen an Mutanten zwingend mit der Sporulation verknüpfen zu können: RNA-Polymerase aus Mutanten, die nicht in der Lage sind zu sporulieren, blieb in deren stationären Zellen strukturell unverändert (38,44). Das Auftauchen veränderter Enzymuntereinheiten kleineren Molekulargewichts wurde nicht auf Neusynthese, sondern auf einen proteolytischen Abbau von Untereinheiten des "vegetativen" Enzyms zurückgeführt (44). Zweifel, ob derartige proteolytische Prozesse tatsächlich in vivo ablaufen, sind jedoch vor allem seit der Arbeit von MILLET et al. berechtigt: diese Autoren konnten durch Inkubation von "vegetativer" RNA-Polymerase aus *B.subtilis* und einer intrazellulären Protease aus *B. megaterium* ein Peptid darstellen, das von der modifizierten β -Untereinheit aus sporulierenden Zellen nicht zu unterscheiden war (46). Zieht man außerdem in Betracht, daß sporulierende Zellen der *Bacillus*-Stämme gerade während der Sporulation besonders hohe Aktivitäten an proteolytischen Enzymen produzieren, die nur schlecht vollständig gehemmt werden können, so müssen isolierte Proteine, die durch proteolytische Einwirkung aus größeren Vorläufern entstehen, überaus kritisch daraufhin untersucht werden, ob sie tatsächlich in vivo gebildet wurden und dort die Rolle spielen, die man ihnen zusprechen könnte, oder ob sie nicht eher Produkte einer völlig unphysiologischen Spaltung in vitro während der Reinigung des Proteins sind.

Bei dem hier untersuchten Organismus *B.cereus*T lassen sich die während der Sporulation auftauchenden Proteasen *in vitro* vollständig hemmen (48). Isoliert man unter solchen Bedingungen die DNA-abh.RNA-Polymerase aus vegetativen und sporulierenden Zellen, so findet man keinen strukturellen Unterschied zwischen den Enzymen. Versuche, die DNA-abh.RNA-Polymerase aus sporulierenden Zellen von *B.cereus* T in Abwesenheit von Proteasehemmern zu isolieren, führten zu einem Enzym, das die großen Untereinheiten in einem nicht stöchiometrischen Verhältnis und darunter ein zusätzlicher, etwas kleineres Peptid enthielt, vergleichbar mit der "modifizierten β -Untereinheit" aus sporulierenden *B.subtilis*-Zellen.

Es könnte der Einwand vorgebracht werden, eine "modifizierte" Sporenform der DNA-abh.RNA-Polymerase liege in *B.cereus*T-Zellen zwar vor, sei jedoch auf Grund der hier verwendeten Reinigungsmethode nicht isoliert worden, mit andern Worten, das hier aus sporulierenden Zellen isolierte Enzym sei nicht repräsentativ für die gesamte in den Zellen enthaltende Transkriptase. In der Tat ist es sehr schwierig zu beurteilen, ob die - quantitativ betrachtet geringe - Menge an RNA-Polymerase, die man gewöhnlich aus prokaryontischen Zellen isolieren kann, die einzig *in vivo* aktive Form darstellt (145). Folgende Gründe sprechen aber dafür, daß nur die eine, hier isolierte Form der RNA-Polymerase in vegetativen und sporulierenden Zellen von *B.cereus*T vorliegt: die Ausbeuten bei den einzelnen Reinigungsschritten aus vegetativen und sporulierenden Zellen sind gut vergleichbar und geben keinen Anlaß anzunehmen, daß etwa eine andere Form nicht mitisoliert wurde. Außerdem konnte auch mit einer immunochemischen Technik (Präzipitation der DNA-abh.RNA-Polymerase aus Rohextrakten mit Anti-Polymerase-Serum) kein Hinweis auf eine modifizierte, aus einer großen Untereinheit *in vivo* abzuleitenden " β_m -Untereinheit" gewonnen werden. Auch bei diesem Verfahren lagen β und β' in dem erwarteten 1:1-Verhältnis vor. Der Literatur zufolge sollte eine neue, kleinere, aus einer großen Untereinheit entstandene Unter-

einheit und der dann zu erwartende Unterschied im $\beta:\beta'$ -Verhältnis mit dieser Technik nachzuweisen sein (144,146).

Eine Bestätigung des Ergebnisses, daß die in sporulierenden Zellen vorliegende RNA-Polymerase nicht von der entsprechenden "vegetativen" RNA-Polymerase von *B.cereus*T zu unterscheiden ist, liefert ein nach Abschluß der hier vorgelegten Arbeit veröffentlichter Befund der Arbeitsgruppe TORRIANI: auch die DNA-abh. RNA-Polymerase aus isolierten, keimenden *B.cereus*-Sporen besitzt die hier beschriebene Struktur (143).

Im Laufe dieser Arbeit mußte auch das ursprüngliche Modell an *B. subtilis* korrigiert werden. LINN et al. konnten die Umwandlung einer großen Untereinheit in ein "verändertes β " insofern auf eine in-vitro-Proteolyse zurückführen, als nach einer "Verdünnung" von sporulierenden mit vegetativen Zellen keine modifizierte RNA-Polymerase beobachtet wurde (146). Anders Autoren gelang es nach Inhibition von Proteasen, aus sporulierenden *B.subtilis*-Zellen ein Minimalenzym mit im Vergleich zu vegetativen Zellen unveränderten β,β' und α -Untereinheiten zu isolieren (86-88, 96); im Gegensatz zu *B.cereus*T gelang es dort aber in keinem Fall, die Untereinheit σ aus sporulierenden Zellen mitzuisolieren (siehe dazu Diskussion weiter unten).

Auf Grund dieser Arbeit und neuer Arbeiten an *B.subtilis* muß man deshalb schließen, daß eine proteolytische Spaltung einer vegetativen großen Untereinheit der DNA-abh. RNA-Polymerase kein notwendiger Schritt für die Anschaltung von Sporengenen ist. Sollte die proteolytische Spaltung von einer Enzymuntereinheit tatsächlich zur Anschaltung von Sporengenen notwendig sein, dürfte es überdies keine normalsporulierende, äußerst proteasearme Mutante geben, wie sie in der Mutante *B.cereus*TC gefunden wurde. Ergebnisse, die an asporogenen und gleichzeitig "modifikationslosen" Mutanten von *B.subtilis* gewonnen wurden und als Beweis für die notwendige in-vivo-Modifikation der DNA-abh. RNA-Polymerase herangezogen wurden (38,44), müssen neu

interpretiert werden, z.B. so, daß die Interaktion eines Faktors mit der Transkriptase gestört ist.

Über *B.thuringiensis*, nahe verwandt zu *B.subtilis* und *B.cereus*T, liegen bisher nur die Berichte von KLIER et al. vor, die auf eine proteolytische Änderung der DNA-abh.RNA-Polymerase während der Sporulation in vivo hindeuten (144). Ein solcher Unterschied zwischen nahe verwandten Bacillusarten wäre sehr überraschend, da man prinzipiell eine gleichartige Regulation der Sporulation annehmen sollte. Zukünftige Arbeit könnte durchaus zeigen, daß auch dort - wie bei *B.subtilis* - die "Modifikationen" nur Sekundärprozesse in vitro sind, zumal die Autoren die Aktion einer spezifischen, unter ihren Versuchsbedingungen nicht hemmbaren Protease nicht vollständig ausschließen konnten.

III. Änderung der Matrizenspezifität der DNA-abh.RNA-Polymerase während der Sporulation?

Da die Struktur der DNA-abh.RNA-Polymerase in vegetativen und sporulierenden Zellen von *B.cereus*T identisch ist, müssen andere Vorgänge als strukturelle Veränderungen der Transkriptase für eine Änderung der Transkriptions-spezifität während der Sporenbildung verantwortlich sein. Man könnte sich vorstellen, die zur spezifischen DNA-Überschreibung in vitro notwendige Untereinheit σ sei zwar während der Sporulation als Peptid vorhanden, aber in ihrer Aktivität durch eine weitere Zellkomponente inhibiert, was eine Änderung der Matrizenspezifität zur Folge hätte.

Ein solcher Fall liegt bei *B.cereus*T nicht vor. Die aus vegetativen und sporulierenden Zellen isolierten RNA-Polymerasen enthalten katalytisch aktiven σ -Faktor. Die z.T. stadienspezifischen Peptide, die mit dem Enzym gereinigt wurden, wirken in keinem Fall als "Anti- σ -Faktoren". Dies zeigt sich unter anderem daran, daß die

Matrizenspezifitäten der isolierten Vollenzyme nicht signifikant variieren. Minimalenzyme und isolierte σ -Faktoren aus vegetativen und sporulierenden Zellen waren nach den hier angewandten Kriterien ebenfalls nicht zu unterscheiden.

Diesen Ergebnissen steht gegenüber, daß aus sporulierenden *B. subtilis*-Zellen bis heute kein Vollenzym gereinigt werden konnte, sondern nur ein Enzym mit minimaler Aktivität an doppelsträngiger Phagen-DNA (ϕ e) und relativ höherer an synthetischem Polyd(AT). Anfänglich hatte man geglaubt, dies auf eine Modifikation einer großen Untereinheit zurückführen zu können (37); nach den neuen Befunden muß man es aber eindeutig mit der Abwesenheit von σ in den gereinigten Enzymen erklären (86-88). Solche Minimalenzym-Aktivität wurde nicht nur an gereinigten Präparationen der DNA-abh. RNA-Polymerase beobachtet, sondern auch an nicht oder nur wenig gereinigten "Rohextrakten" aus sporulierenden Zellen. In entsprechenden "Rohextrakten" aus vegetativen Zellen fand man dagegen Vollenzym-Aktivität (96-98). Diese Änderung der Matrizenspezifität - bezogen auf die Matrizen ϕ e-DNA und Polyd(AT) - gilt einigen Autoren als Modell für die in-vivo-Änderungen der Transkription während der Sporulation (86,96,147).

Es war lange Zeit unklar, ob die minimale Aktivität der Transkriptase aus sporulierenden *B. subtilis*-Zellen darauf zurückzuführen ist, daß σ als Peptid während der Sporulation verschwindet oder in seiner Aktivität inhibiert wird. Inzwischen konnte man mit immunochemischen Techniken den Nachweis führen, daß σ in vegetativen und sporulierenden Zellen in immunologisch nicht unterscheidbarer Form vorliegt (75, 148). Da aber die σ -Aktivität in wenig gereinigten Präparationen aus sporulierenden Zellen nicht gemessen (96, 149) bzw. nicht Minimalenzym-gebunden isoliert werden kann, nehmen einige Autoren eine Inaktivierung des σ -Faktors durch einen hypothetischen, bisher nicht iden-

tifizierten "Anti- σ -Faktor" an (76,149). Man könnte sich auf Grund dieser Ergebnisse an *B. subtilis* fragen, ob das aus sporulierenden *B. cereus*T-Zellen isolierbare Vollenzym einen physiologischen Zustand des Enzyms wiedergibt. Es wäre immerhin denkbar, daß infolge der besonderen Art der Enzymreinigung ein solcher "Anti- σ -Faktor" entfernt wurde. Auf Grund der Transkriptionsstudien mit Rohextrakten muß dies aber weitgehend ausgeschlossen werden: unter optimalen Testbedingungen - d.h. kurze Syntheszeit, niedere Rohextraktkonzentrationen - unterscheiden sich die Matrizen-spezifitäten für vegetative und sporulierende Zellen nicht in der Weise, wie bei einer σ -Inaktivierung zu erwarten wäre und wie bei *B. subtilis* in ähnlichen Versuchen beschrieben (96-98). Freilich kann man unter ungünstigen Bedingungen - Syntheszeiten über 10 Minuten, hohe Rohextraktkonzentrationen - eine scheinbare Änderung der Matrizen-spezifität beobachten. Dies ist jedoch nur auf die Überlagerung zweier Effekte zurückzuführen: auf Beeinflussung von RNA-Synthese und Abbau. Während kein Ergebnis für einen verstärkten Abbau der RNA in Rohextrakten aus sporulierenden gegenüber vegetativen Zellen spricht, liegen für eine Hemmung der Synthese durch eine proteolytische Inaktivierung der DNA-abh.RNA-Polymerase in Extrakten aus sporulierenden Zellen starke Hinweise vor.

Wie gezeigt wurde, kann eine aus sporulierenden Zellen angereicherte Protease Untereinheiten der DNA-abh.RNA-Polymerase, besonders σ , aber auch die großen Untereinheiten, mindestens partiell hydrolysieren. Die RNA-Synthese an einer besonders " σ -abhängigen" Matrize wie ϕ CL-DNA wird dadurch erheblich mehr beeinträchtigt als die an der "einfachen" Matrize Polyd(AT).

Durch Studien an der proteasearmen, normal sporulierenden Mutante *B. cereus*TC konnte äußerst unwahrscheinlich gemacht werden, daß eine proteolytische Inaktivierung von Enzymuntereinheiten eine Rolle in vivo während der Sporulation spielt.

Diese Mutante sporuliert mit gleicher Effizienz wie der Wildtyp *B.cereus*T; anders als bei diesem, war bei Langzeitsynthese und hoher Rohextraktkonzentration keine Erniedrigung der Transkriptaseaktivität an ds-DNA vorge-täuscht. Für einen "Anti- σ -Faktor" gibt es keinen Hinweis.

Interessanterweise zeigt sich an einzelsträngiger DNA ein Effekt, der mit dem Beginn der irreversiblen Sporulationsphase korreliert werden kann: die Transkriptasen in Rohextrakten, die von t_3 - oder späteren Zellen stammen - entfalten an einzelsträngiger DNA eine relative Aktivität (bezogen auf doppelsträngige Phagen-DNA), die derjenigen von isoliertem Vollenzym zu vergleichen ist; demgegenüber sind die Transkriptasen aus "vegetativen" Rohextrakten praktisch nicht in der Lage, Einzelstrang-DNA als Matrize zu verwenden. Ob dies auf Sekundäreffekte, z.B. auf Wirkung einer Einzelstrang-spezifischen, nur in vegetativen Zellen enthaltenen Nuklease, oder auf Einfluß von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist, müssen weitere Arbeiten zeigen. Dabei könnte sich durchaus erweisen, daß eine zunächst "unphysiologisch" erscheinende Einzelstrang-DNA eine geeignetere Modellmatrize für in vitro-Transkriptionsstudien abgibt als Doppelstrang-Phagen DNA.

Überhaupt muß man sich fragen, inwieweit die eingesetzten Phagen-DNAs "kompetent" sind, d.h. die notwendigen Signale tragen, die eine Regulation durch sporulationsspezifische Peptide ermöglichen. Nicht notwendigerweise muß die Ablesung von relativ einfachen Matrizen wie Phagen-DNA die gleichen Erfordernisse haben wie die in-vivo-Transkription von bakterieller DNA (100,150). Zweifel lassen sich z.B. deshalb anmelden, weil eine heterologe DNA wie diejenige des *E.coli*-Phagen T5 in vitro erheblich besser transkribiert wird als die homologe *B.cereus*T-DNA. Dieses Problem ist nicht auf *B.cereus*T beschränkt, sondern findet sich auch bei dem gut untersuchten *E.coli*-System (74). Man muß

sich die Frage stellen, warum Bakterien-DNA für isolierte DNA-abh.RNA-Polymerase nur eine recht schlechte Matrize abgibt. Ein Grund könnte sein, daß die Bakterien-DNA nicht intakt vorliegt. Aus Bakterien ist - im Unterschied zu Bakteriophagen - auf Grund ihrer Größe eine intakte DNA praktisch nicht zu isolieren. Ein weiterer, vermutlich gewichtiger Grund könnte sein, daß zur sinnvollen Ablesung von Bakterien-DNA zusätzliche Faktoren notwendig sind. Im seit längerer Zeit untersuchten E.coli-System hat man eine Reihe von zusätzlichen Faktoren gefunden, die entweder zu einer Stimulierung der Transkription an bakteriellen Genen, wie z.B. das CAP-Protein (94), oder zu einer Erniedrigung, wie z.B. der ρ -Faktor, führen (151). Zwar findet man auch bei B.cereusT - wie bei B.subtilis - einige auffällige, teils stadienspezifische Peptide, die entweder mit der DNA-abh.RNA-Polymerase gereinigt werden (86-92, 143) oder an immobilisierte DNA binden (84-85, 93) und damit als Kandidaten für derartige Regulationsfaktoren in Betracht zu ziehen sind, aber keinem dieser Peptide konnte bis dato ein Einfluß auf die Transkription durch Vollenzym zugeschrieben werden. Für einige Faktoren wird eine Erhöhung der Minimalenzymaktivität beschrieben (87, 92).

Wegen der ungewissen Kompetenz der Phagen-DNAs sollten sich weitere Untersuchungen vorwiegend auf die zwar schlecht transkribierte, jedoch natürliche Signale wie Promotoren und Terminatoren für die Ablesung von Sporengenen tragende bakterielle DNA konzentrieren. Erste Versuche in dieser Richtung wurden vorgestellt. Sie bestätigen, daß die Transkriptaseaktivität in Rohextrakten mindestens zum Teil selektiv ist, da Hybridisierungsexperimenten zufolge etwa 75 % der "in-vitro-RNA" am H-Strang der B-cereusT-DNA abgelesen wurde. In diesem Verhalten zeigte sich ein kleiner Unterschied zwischen vegetativen und sporulierenden Zellen, dessen Signifikanz allerdings zweifelhaft ist. Der Großteil der hybridisierten "Sporulations-RNA" ist dabei nicht von hybridisierter "vegetativer-RNA" zu unterscheiden, da

beide durch RNA, die aus vegetativen Zellen stammte, im gleichen Ausmaß kompetiert wurden. Unterschiedliche Klassen "vegetativer" und "sporulierender" "in-vitro-RNA" könnten jedoch unter dem Teil zu finden sein, der nur sehr schlecht durch "in-vivo-RNA" zu verdrängen war oder der mit dem L-Strang hybridisierte.

Unabhängig vom Reinheitsgrad ist die Aktivität der DNA-abh. RNA-Polymerase aus sporulierenden *B. cereus* T-Zellen nach all diesen Studien von derjenigen aus vegetativen Zellen prinzipiell nicht verschieden, d.h. eine Änderung ihrer Matrizenspezifität, die von einigen Autoren auf Grund von Untersuchungen an *B. subtilis* als charakteristisch für dieses Enzym während der Sporulation erachtet wird, kann man nicht beobachten. Im Falle von *B. subtilis* könnte sich die "Änderung der Matrizenspezifität" in Zukunft ebenso als Sekundäreffekt herausstellen wie die angeblich zur Ablesung von Sporengenen notwendige Modifikation einer großen Untereinheit. Dies liegt schon deshalb nahe, weil die beschriebene Änderung der Matrizenspezifität in keinem Fall die Transkription zusätzlicher Gene bewirkt, sondern das N i c h t - Ablesen von Genen, nämlich Phagen-DNA. In vivo dürfte aber gerade das Abschalten von vegetativen Genen weniger gewichtig sein als das Anschalten von Sporen-Genen. So weiß man heute, daß im Gegensatz zu früheren Behauptungen (40) ribosomale RNA auch in sporulierenden Zellen synthetisiert wird (42,43). Sehr fraglich ist außerdem die Verwendung von ϕ e-DNA als Modellsystem für die Untersuchung von Transkriptionsspezifität: das Unvermögen der Transkriptase aus sporulierenden *B. subtilis*-Zellen, die DNA des *B. subtilis*-Phagen ϕ e zu transkribieren, galt insofern als typisch für Sporulationsereignisse, als auch der Phage in sporulierenden Zellen weder vermehrt noch transkribiert werden sollte (36). KAWAMURA und ITO konnten vor kurzem aber nachweisen, daß diese Voraussetzung nicht richtig ist, da ϕ e auch während der frühen Sporulationsphase, in der die

in-vitro-Änderungen beobachtet werden, transkribiert und propagiert wird (152-153). Hieraus würde man schließen, daß zu dieser Zeit Vollenzym in vivo aktiv ist, die beobachtete Hemmung in vitro daher sekundärer, unphysiologischer Natur sein muß. Die These, daß die Änderung der Matrizenspezifität bei *B. subtilis* durch einen Sekundärprozeß vorgetäuscht wird, findet auch darin Unterstützung, daß dieser Effekt von der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängt: MURRAY et al. beobachteten ungestörte Sporenbildung in sog. "SM"- oder "DDS"-Medien, eine Änderung der Matrizenspezifität der RNA-Polymerase nur bei sporulierenden Zellen, die in "DDS-Medium", nicht aber in "SM-Medium" gewachsen waren (98). Als mögliche Ursachen dieses postulierten Sekundäreffektes sind m.E. vor allem zwei Punkte näher zu untersuchen: 1) eine proteolytische Inaktivierung des σ -Faktors von *B. subtilis* während der Aktivitätsbestimmung der RNA-Polymerase in Rohextrakten, wie sie unter bestimmten Bedingungen als Nebenreaktion auch bei *B. cereus* beobachtet werden kann, 2) die Wirkung einer spezifischen RNase in Rohextrakten. KERJAN und SZULMAJSTER konnten nämlich zeigen, daß solche Präparationen aus sporulierenden *B. subtilis*-Zellen eine RNase enthalten, die zwar ϕ -kodierte, nicht aber Polyd(AT)-kodierte RNA zu hydrolysieren vermag (154). Dies könnte natürlich eine Änderung der Matrizenspezifität vortäuschen.

IV. Ausblick

Wir sind weit davon entfernt, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die eine Bacillus-Zelle zur Sporenbildung und damit zur Ausprägung normalerweise ruhender genetischer Information befähigt. Eine zahlreiche nachfolgende Arbeiten befruchtende Modellvorstellung von LOSICK und Mitarbeitern - eine strukturelle Modifikation der DNA-abh. RNA-Polymerase bedingt eine Änderung der Transkriptasespezifität (36-41) - kann in dieser Form nicht aufrechterhalten werden. Künftige Arbeiten müssen erst erweisen, ob und wie zusätzliche, stadienspezifische Peptide eine Änderung der Transkriptionsspezifität bewirken. Der Modellvorstellung von SCHAEFFER et al., in vegetativen Zellen sei die Sporulation durch einen Kataboliten reprimiert (35), ist verstärkte Bedeutung zuzumessen. Um dafür in vitro-Modelle zu finden, sind neben DNA-bindenden Proteinen als möglichen Repressoren auch niedermolekulare Zellkomponenten auf Transkriptionsbeeinflussung zu studieren, so z.B. atypische Nukleosidphosphate (155-160) oder ein Faktor wie "Sporogen" aus *B.cereus*T, dem eine Induktion der Sporulation in vivo zugeschrieben wurde (161,162).

Als limitierend freilich für derartige Untersuchungen muß vor allem die fragliche Kompetenz der zur Verfügung stehenden Matrizen angesehen werden. Die Techniken der modernen Genetik lassen jedoch Hilfe erwarten in der Konstruktion und Verwendung geeigneter Modellmatrizen, z.B. durch die Darstellung eines kompletten Sporulationsgenes, angereichert auf der relativ kleinen DNA eines transduzierenden Phagen.

Material und Methoden

Bezugsquellen von Substanzen

B.cereusT, B.cereusTR, Phage ØCL:	Dr. V.R. Srinivasan
B.cereusTC	: Dr. A. Aronson
B.stearothermophilus NU 10, Pha-	
ge Øµ4	: Dr. K. Zechel
Phage T7	: Dr. W. Zillig
Ribonuklease A aus Rinderpan-	
kreas	: Fa. Boehringer, Mannheim
Pyruvatkinase, Trypsin, Lysozym	"
Phosphoenolpyruvat, K ⁺ -Salz	"
polyguanyl-uridylsäure, poly-	
(G,U)	"
poly-desoxy-adenyl-desoxy-	
thymidylsäure polyd(AT)	"
ATP, UTP, CTP	"
GTP; Kalbsthymus-DNA	Fa. Sigma, St. Louis
ATP, 8-14-C markiert	Amersham/Buchler, Braunschweig
Desoxyribonuklease	Worthington, New Jersey
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Azocasein, Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
(SDS), Acrylamid, Methylen-	"
bis-acrylamid	
Heparin	CIBA AG., Basel (Geschenk)
Rifampicin	"
PolyminP	BASF, Ludwigshafen
Silicon-Antischaum	Wacker-Chemie, München
2-Mercaptoäthanol	Fluka, Basel
Rohrzucker, Enzymgrad	Mann Res., New York
DEAE-Cellulose	Serva, Heidelberg
Cellulosepulver MN 2200 ff	Macherey, Nagel u. Co, Düren
Phospho-cellulose	Whatman, Maidstone
Membranfilter	Sartorius, Göttingen

Cellogel-Streifen	Chemetron, Milano
Glasperlen	Dragon-Werk, Bayreuth
2.5-Diphenyloxazol (PPO)	Interchem, München
1.4-Bis-2(5-phenyloxazol- benzol (POPOP)	"
Sonstige Chemikalien, minde- stens p.a.	Merck, Darmstadt

Die folgenden Substanzen wurden von den aufgeführten Herren freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

T4-DNA	Dr. R. Mailhammer
T5-DNA	Dr. P. Palm
DNA-abh. RNA-Polymerase aus E.coli (Vollenzym, Minimalenzym, σ -Faktor)	Dr. W. Zillig
σ -Faktoren und Minimalenzyme aus L. curvatus und L.casei	Dr. K. Stetter

Puffer und Medien

- "TMA-Puffer" : 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5; 0.022 M NH_4Cl ;
25 μM EDTA; 0.01 M Mg-acetat; 0.01 M β -Mercaptoäthanol;
- "TMAG-Puffer": wie TMA-Puffer, zusätzlich 10 % Glycerin
- "TEA-Puffer": 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5; 0.022 M NH_4Cl ;
0.05 M EDTA; 0.01 M β -Mercaptoäthanol,
1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)
- "TEAG-Puffer": wie TEA-Puffer, zusätzlich 10 % Glycerin
- "TEMEG" : 0.01 M Tris-HCl, pH 7.9; 0.001 M EDTA ; 0.001 M β -Mercaptoäthanol; 5 % Glycerin
- SSC-Puffer : 0.15 M NaCl; 0.015 M Na-citrat, pH 7.0
- "PC-Puffer" : 0.05 M Tris-HCl pH 8.0; 0.001 M EDTA,
0.001 M β -Mercaptoäthanol, 20 % Glycerin,
0.1 M KCl

Cellogel-Puffer

Harnstoff-Trennpuffer: 0.4 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$; 0.02 M β -Mercapto-
äthanol; 0.001 M EDTA; 20 % Di-
methylformamid; 6 M Harnstoff,
pH 9.0

Phosphat-Trennpuffer : 0.2 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.5, 1 mM
("neutral") EDTA; 0.01 M β -Mercaptoäthanol;
0.01 % Brij 58; 10 % Glycerin

Rekonstitutions-Puffer: 0.05 M Triäthanolamin-acetat pH 7.7;

- A) 0.001 M EDTA, 0.02 M β -Mercapto-
äthanol, 0.01 % Brij 58, 40 % Gly-
cerin
- B) 0.05 M Tris-Acetate pH 7.9; 0.01 M
Mg-Acetate; 0.001 M EDTA; 0.02 M β -
Mercaptoäthanol; 0.2 M KCl; 20 % (v/v)
Glycerin

G-Medium (12) : 0.00005 % $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.00005 %
 $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; 0.00005 % $\text{ZnSO}_4 \times$
7 H_2O ; 0.005 % $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$; 0.02 %
 MgSO_4 ; 0.0025 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.05 %
 K_2HPO_4 ; 0.2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 % Hefe-
extrakt; 0.5 % Glukose für vegetati-
ve Zellen oder 0.2 % Glukose für
sporulierende Zellen

NBY-Medium : 0.5 % Bacto-Pepton; 0.3 % Fleisch-
extrakt (Bacto), 0.2 % Bacto-Hefe-
extrakt; 0.016 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Agar für Phagentest : 0.5 % Bacto-Pepton; 0.3 % Fleisch-
extrakt (Bacto), 1.5 % (unterer) bzw.
0.7 % (oberer)-Agar.

Toluolszintillator : 4.5 g PPO; 1.5 g POPOP pro 1 Toluol

Bakterienzucht, Phagenzucht

*B.cereus*T-Stämme wurden nach Hanson et al. gezogen (12). Die Großzucht wurde in einem 250 l Fermenter (Bioengineering) bei 32° C in Medium G durchgeführt und die Zellen zu den Zeiten t_{-1} , $t_{1.5}$, t_3 , t_5 oder t_{12} geerntet. Hierzu wurden sie rasch mit Eis auf 4° C abgekühlt und mit einer Durchfluß-Zentrifuge (Padberg) gesammelt. Vegetative Zellen wurden mit eiskaltem Medium G, sporulierende Zellen mit TEA-Puffer + 1 M KCl gewaschen und bei -80° C gelagert, sofern nicht sofort zur Isolierung der DNA-abh. RNA-Polymerase verwendet.

B.stearothermophilus NU 10 wurde ebenfalls im Fermenter gezüchtet; die Zellen wurden im logarithmischen Wachstum geerntet (Zuchttemperatur 55° C in 1 % Bacto-Trypton; 0.5 % Hefeextrakt; 0.5 % NaCl; 0.2 % Glukose, pH 7.0).

Die Phagen T7 und Øµ4 wurden wie in der Literatur beschrieben gezüchtet (163, 164), ØCL wie im Anhang beschrieben.

Für spezielle Zwecke wurde ØCL auch wie folgt präpariert: Nach erfolgter Lyse Entfernung von Bakterien und Bakterientrümmern durch niedertourige Zentrifugation (15 Min., 10 000 upm, Sorvall GSA-Rotor); die Phagen wurden aus dem Überstand durch hochtourige Zentrifugation gesammelt (90 Min, 30 000 upm, Rotor 30, Beckmann L5) und in gewünschtem Puffer, z.B. 0.1 M Ammoniumacetat pH 7.0, aufgenommen.

Reinigung der DNA-abh.RNA-Polymerase

(Alle Operationen bei 0° C)

40 g Zellen wurden in 40 ml TEAG- oder TMAG-Puffer und 0.2 ml Silicon-Antischaum suspendiert, mit Glasperlen (Ø 0.15-0.18 mm) zu einem homogenen Brei verrührt und in einer Zelmühle (55) für die im Ergebnisteil angegebenen

Zeiten aufgeschlossen. Die Glasperlen wurden anschließend über einer Glasfritte abgetrennt und mit 2 x 40 ml TEAG- bzw. TMAG-Puffer gewaschen. Das Filtrat wurde mit 15 ml einer 5 %-igen PolymixP-Lösung versetzt. (PolymixP zuvor gegen den gewünschten Reinigungspuffer dialysiert). 30 Minuten später wurde der flockige Niederschlag abzentrifugiert (20 Min. 15 000 upm, JA-20 Rotor, Beckmann-Zentrifuge J 21). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 4 x 60 ml TEAG- bzw. TMAG-Puffer + 0.6 M NH_4Cl gewaschen und wie oben zentrifugiert. Die RNA-Polymerase wurde vom verbleibenden Niederschlag mit 0.9 M NH_4Cl in TEAG- bzw. TMAG-Puffer eluiert (4 x 60 ml). Die RNA-Polymerase-haltigen Fraktionen wurden durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konzentriert (bei 45-70 % Sättigung).

Weitere Reinigungsschritte -Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugation, DNA-Affinitätschromatographie, Trennung an Phospho-Cellulose - sind im Ergebnisteil beschrieben.

Darstellung der Rohextrakte

Hierzu wurden nur Zellen verwendet, die aus 1- oder 2-1-Zuchtansätzen stammten; zu den angegebenen Erntezeitpunkten (Abb. 1) wurde NaN_3 zugegeben (Endkonzentration 0.1 M), 5 Min. weiterbelüftet und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5 Min, 14 000 upm, JA 14, Beckmann-Zentrifuge J 21) und gewaschen wie oben beschrieben. Aufgeschlossen wurden die Zellen entweder mit Glasperlen wie bei der Isolierung beschrieben oder durch Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier : Schritte a 30 sec mit Pause von 60 sec; Anzahl der Schritte für vegetative Zellen: 5, für sporulierende bis zu 20). Die Aufbereitung der einzelnen Rohextrakt-Fractionen ist der Tab. 23 zu entnehmen. Die Rohextrakte konnten ohne Aktivitätsverlust in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Tab. 23: Schema der Rohextraktpräparation

Lyse

(2g Zellen, 4 ml Puffer,
Ultraschall oder Glas-
perlen)

Zentrifugation

15 Min., 15 500 upm
(30 000 x g)
Überstand: R30
90 Min., 30 000 upm
(100 000 x g)
Überstand: R100

DEAE-Cellulose-Chromatographie.
("batch", 45 Min. stehen bei 0°C)

Extraktion mit 60 ml Puffer + 0.25 M NH_4Cl	1) Waschen mit 30 ml Puffer	2) Eluieren mit 30 ml Puffer + 0.25 M NH_4Cl
(0-80 %) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung	(0-80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	(0-80%) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung
Niederschlag in 1-4 ml Puffer lösen =	Niederschlag in 2 ml Puffer lö- sen =	Niederschlag in 1-2 ml Puffer lösen =
DEAE-Cellulose-Fraktion	Subfraktion II	Subfraktion I
	(30-40 %) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	
	Niederschlag in 1 ml Puffer lösen = p-Fraktion	

Puffer: TEAG

Antikörper gegen DNA-abh.RNA-Polymerase aus B.cereusT

1.5 mg DNA-abh.RNA-Polymerase (Vollenzym) wurden einem Kaninchen in 2 Portionen im Abstand von 3 Wochen mit komplettem Freund'schem Adjuvans (Difco-Lab., Detroit) subkutan und intramuskulär injiziert; 7 Tage nach der 2. Injektion wurden 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und daraus durch Zentrifugation das Anti-Polymerase-Serum gewonnen.

Antikörper-Präzipitation:

DNA-abh.RNA-Polymerase-Präparationen (5-10 Einheiten) wurden in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml TEA-Puffer + 40 % Glycerin mit 0.05 - 0.1 ml Antiserum versetzt, für 30 min bei 30° C und anschließend über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden durch Zentrifugation gesammelt (Eppendorfgeläße, Adapter für J 21), 3 x mit je 0.5 ml TEA-Puffer + 40 % Glycerin, 1 x mit 0.5 ml TEA-Puffer gewaschen und anschließend in 0.025-0.050 ml Probenpuffer nach LÄMMLI(121) aufgenommen. Nach Erhitzen (5 min. 100° C) wurden die Präzipitate auf Polyacrylamidgelen getrennt (s.u.).

Isolierung der Nukleinsäuren

B.cereusT-DNA wurde aus vegetativen Zellen nach MARMUR (165) oder SAITO und MIURA (166) gereinigt. Als zusätzlicher Schritt wurde die nach beiden Verfahren gereinigte DNA über CsCl-Gleichgewichts-Zentrifugation gereinigt (Ausgangsdichte CsCl $\rho = 1.73$, Zentrifugation 40 h, 40 000 upm, SW 50.1, Beckmann L5-Zentrifuge) und gegen 0.01 M TrisHCl, pH 7.9, 0.001 M EDTA dialysiert.

Strangtrennung von B.cereusT-DNA

Ca. 50 µg B.cereusT-DNA wurden mit 100 µg Poly(G,U) in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml 2 x SSC-Puffer 10 Min. im kochenden Wasserbad denaturiert, abgeschreckt auf Eis und

mit konzentrierter CsCl-Lösung auf eine Dichte von $\rho = 1.73$ eingestellt (Endvolumen 2.5 ml). Die Lösung wurde, mit Paraffinöl überschichtet, für 48 Stunden in einem SW 50.1 Rotor bei 30 000 upm zentrifugiert. Der gebildete Gradient wurde ausgetropft und die OD_{260} gemessen wie in Abb. 23 beschrieben. Die Dichte der Fraktionen wurde refraktometrisch bestimmt.

Phagen-DNA wurde durch Phenolextraktion (107) oder SDS-Behandlung (108) gewonnen. Die Analyse in neutralen bzw. alkalischen Rohrzuckergradienten folgte der Vorschrift von ABELSON und THOMAS (113); zur Zentrifugation wurde ein SW50.1 Rotor in einer Beckmann L-5 Zentrifuge benutzt.

B.cereusT-RNA wurde in Anlehnung an SUMMERS isoliert (104): 2 g B.cereusT-Zellen, in 5 ml 0.015 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.001 M NaCl, 0.008 M EDTA, 0.0001 M Na-citrat aufgenommen, wurden 3 x 1 min mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier), auf 20 ml mit gleichem Puffer verdünnt, mit 0.9 ml Diäthylpyrocarbonat (BAYER) und 10% SDS versetzt und für 5 Min bei 37° C inkubiert. Das auf 0° C abgekühlte Homogenat wurde 10 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert und der Überstand mit 3 Volumen Äthanol gefällt und über Nacht bei -20° C stehen gelassen zur Fällung der RNA. Nach Zentrifugation wurde die RNA in 2 x SSC-Puffer aufgenommen und gegen denselben Puffer dialysiert. 25 µg RNA wurden über einen linearen Rohrzuckergradienten (15-30 %) in 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.1 % SDS, 0.1 % Na-desoxycholat, 0.01 % Diäthylpyrocarbonat analysiert (Zentrifugationsbedingungen: 5 Std. SW 50.1, 50 000 upm, 4° C).

"In-vitro-RNA", an ϕ CL-DNA synthetisiert, wurde aus 10-fachen Standardansätzen für die RNA-Synthese (s.u.) wie beschrieben isoliert und gegen 2 x SSC-Puffer dialysiert (164).

Aktivitätsbestimmung der DNA-abh. RNA-Polymerase

Der "Standardansatz" enthielt in 250 μ l: 0.03 M Tris-HCl pH 8.3, 0.02 M $MgCl_2$, 1 mM CTP, GTP und UTP, 1 mM 8-14 -C-markiertes ATP (1 Ci/Mol), 40-60 μ g ϕ CL-DNA/ml, 5 μ g Pyruvatkinase, 10 mM Phosphoenolpyruvat und die im Versuch angegebenen Mengen Enzym und KCl. Enzym aus *B. cereus* T wurde bei 37° C, aus *B. stearothermophilus* NU 10 bei 50° C für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 % Trichloressigsäure gestoppt und die säureunlösliche Radioaktivität auf Filtern nach Literatur bestimmt (49) (siehe auch unten). Die Aktivität ist angegeben in pMol- oder nMol-14-C-AMP-Einbau in säureunlösliches Material bzw. in "mE" (= milli-Einheiten = 1 nMol 14-C-AMP-Einbau/Minute) oder "mE/mg". In wenigen Fällen sind auch "cpm" angegeben (Impulse pro Minute im Szintillationszähler). Zur Bestimmung der Matrizenspezifität wurden die angegebenen Matrizen in einer Konzentration von 40-160 μ g/ml eingesetzt (jeweils im DNA-Sättigungsbereich).

Der mehrphasige Test zur Bestimmung der "Heparinstabilität" folgte dem Schema von ZECHER (62). Der "MixS" besteht aus 0.15 M Tris-Cl pH 8.2, 5 mM GTP, UTP, CTP, 0.1 M $MgCl_2$, 0.05 M Phosphoenolpyruvat, 100 μ g/ml Pyruvatkinase.

Aktivitätsbestimmung von Proteasen

Eine in der Literatur angegebene Methode (167) wurde variiert: 2 mg/ml Azocasein und die zu bestimmende Proteaselösung wurden in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.2, 0.002 M $CaCl_2$ in insgesamt 1 ml Volumen für 30-60 Min. bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1.0 ml 10 % Trichloressigsäure gestoppt und nach 15 min. der gefällte Ansatz bei 0° C in einer Laborzentrifuge (Christ) zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein 0.8 ml-Aliquot entnommen, mit 0.2 ml 1.8 N NaOH versetzt und gegen einen gleich behandelten Leerwert ohne Protease die optische Dichte bei 420 nm gemessen. Die Aktivitäten sind angegeben als "mg Azocasein hydrolysiert/Stunde". Trypsin diente als Eich-Protease.

DNA-RNA-Hybridisierung erfolgte auf Membranfiltern nach (115) bzw. in Lösung nach (102).

Ansätze in Lösung (2 x SSC) enthielten in einem Gesamtvolumen von 0.2 ml 2 µg H- bzw. L-Strang der B.cereusT-DNA (dialysiert nach SALSER zur Entfernung von Poly(G,U), 168) und die indizierten Mengen RNA. Die Hybridisierung wurde bei 68° C für 41 Stunden durchgeführt, anschließend auf 34° C abgekühlt und in einem Gesamtvolumen von 1 ml 2xSSC mit DNase-freier pankreatischer RNase (8µg/ml) für 1 Stunde weiterinkubiert. Die Ansätze wurden danach über Cellulosenitratfilter filtriert und gewaschen wie beschrieben (102); die Filter wurden 15 Min. bei 100° C getrocknet und die Radioaktivität in Toluolszintillator mit einem Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer gemessen (Packard Tricarb Modell 3375 oder Searle, Nuclear Chicago Division, Modell Mark II).

Proteinbestimmung wurde nach HEIL und ZILLIG durchgeführt (60).

DNA wurde nach DISCHE bestimmt (109), routinemäßig durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Bezugswert $E_{260}^{1\%} = 20(\text{mgml})^{-1}$

RNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Bezugswert $E_{260}^{1\%} = 25(\text{mgml})^{-1}$

UV-Messung Extinktionen im sichtbaren und ultravioletten Bereich wurden mit einem Zeiss PMQII- oder Gilford 240-Spektrophotometer durchgeführt. Extinktionen von Proteinen bzw. Nukleinsäuren bei der Elution von Säulen bzw. Analyse von Gradienten wurden mittels Mikrodurchflußküvetten in registrierenden Spektrophotometern bestimmt (Gilford 240, Cecil CE 212 oder Hitachi 181).

Cellogelelektrophorese erfolgte nach HEIL und ZILLIG (60).

Die Dauer der Elektrophorese betrug unter "neutralen" Bedingungen 90 Minuten, bei "alkalischen" Bedingungen (Harnstoffanwesenheit) 2.5 - 3.5 Stunden. Es wurde eine maximale Verlustleistung von 18-20 Watt pro Celluloseacetat-Streifen erlaubt. Zur präparativen Darstellung von Unter-einheiten wurde ein 2 mm-breites Aliquot des Streifens ge-

färbt (169) und die Proteinbanden des ungefärbten Reststreifens hiernach ausgeschnitten. Diese Banden wurden in Polyäthylentrichter gefüllt, diese in Eppendorf-Reaktionsgefäße gesteckt und über Adaptoren 10 Min. bei 20 000 upm zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SE 12). Über 95 % der im Cellogelestückchen enthaltenen Pufferlösung (ca. 50-100 µl/Untereinheit) und damit ca. 50 % der aufgetragenen Proteinmenge wurde so gewonnen (169).

Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS

Wurde in Plattengelen (12 x 12 x 0.15 cm³) wie bei BOYD et al. durchgeführt (64) in einem Puffersystem nach LÄMMLI (121). Folgende Ausgangslösungen wurden zur Präparation der Gele benutzt:

- a) Sammelgel: 3 % Acrylamid, 0.08 % Methylen-bis-acrylamid (MBA), 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.025 % Tetramethylaethylendiamin(TMED), 0.3-0.6 mg/ml Ammoniumpersulfat (APS).
- b) Trenngele:
 - α) konstantes: 10 % Acrylamid, 0.26 % MBA, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.0125 % TMED, 0.15-0.3 mg/ml APS
 - β) linearer Gradient: 10 % Acrylamid, 0.26 % MBA bis 20 % Acrylamid, 0.52 % MBA in 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.0125 % TMED, 0.15-0.3 mg/ml APS
 - γ) logarithmischer Gradient (170): 5 % Acrylamid, 0.13 % MBA bis 25 % Acrylamid, 0.66 % MBA in 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.0125 % TMED, 0.15-0.3 mg/ml APS

Der "Probenpuffer" bestand aus 0.065 M Tris-HCl pH 6.8, 3 % SDS, 5 % β-Mercaptoäthanol, 10 % Glycerin, 0.001% Bromphenolblau. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0.025 M Tris, 0.192 M Glycin, pH 8.3-8.4, 0.1 % SDS. Elektrophoresedauer 12 Stdn. bei ca. 3 Watt, 4-5 Stdn. bei ca. 9 Watt Verlustleistung.

ZUSAMMENFASSUNG

Um die Mechanismen zu studieren, die während der Sporulation von *Bacillus*-stämmen zu einer Änderung der Transkriptions-spezifität führen, wurden die DNA-abh. RNA-Polymerasen aus vegetativen und sporulierenden Zellen von *B. cereus* T, dessen Wachstumsstadien gut zu synchronisieren sind, isoliert und charakterisiert. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- die Struktur $(\beta\beta'\alpha_2)\sigma$ der isolierten Enzyme ist allen Stadien gemeinsam; Größe und Ladungsdichte der Untereinheiten ändern sich während der Sporulation nicht
- Aktivität und Matrizenspezifität der isolierten Enzyme bleiben während der Sporulation unverändert
- die Matrizenspezifität in Extrakten aus vegetativen und sporulierenden Zellen von *B. cereus* T sowie der normal sporulierenden, jedoch proteasearmen Mutante *B. cereus* TC zeigt keinen signifikanten Unterschied außer bei Verwendung von ss-DNA als Matrize; die unter bestimmten Bedingungen vorgetäuschte Änderung der Matrizenspezifität in Rohextrakten aus sporulierenden *B. cereus* T-Zellen ist auf eine proteolytische Inaktivierung von Untereinheiten *in vitro* zurückzuführen.

Im Anhang wird der *B. cereus* T-Phage ϕ CL charakterisiert. Seine DNA vom Molekulargewicht um 100×10^6 ist die wirksamste Matrize für die Transkriptase aus *B. cereus* T und *B. stearothermophilus* NU10. Der σ -Faktor aus *B. stearothermophilus* NU10 wird zum ersten Mal beschrieben. Er hat ein Molekulargewicht von 52 000.

Literatur

1. Fitz-James, P., Young, E., in: "The Bacterial Spore", ed. Gould, G.W., Hurst, A., Academic Press, London (1969)
2. Halvorson, H.O., Vary, J.C., Steinberg, W., Ann. Rev. Microbiol. 20, 169 (1966)
3. Freese, E., in: "Current Topics in Developmental Biology", 7, 85, ed. Moscona, A.A. Monroy, A., Academic Press, New York (1972)
4. Hanson, R.S., Peterson, J.A., Yousten, A.A., Ann. Rev. Microbiol. 24, 53 (1970)
5. Young, E., Fitz-James, P.C., J. Cell. Biol. 12, 115 (1962)
6. Waites, W.M., Biochem. J. 109, 803 (1968)
7. Warren, S.C., Biochem. J. 109, 811 (1968)
8. Levisohn, S., Aronson, A.I., J. Bact. 93, 1023 (1967)
9. Bernlohr, R.W., J. Biol. Chem. 239, 538 (1964)
10. Bach, J.A., Sadoff, H.L., J. Bact. 83, 699 (1962)
11. Hanson, R.S., Srinivasan, V.R., Halvorson, H.O., Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 457 (1961)
12. Hanson, R.S., Srinivasan, V.R., Halvorson, H.O., J. Bact. 85, 451 (1963)
13. Hanson, R.S., Srinivasan, V.R., Halvorson, H.O., J. Bact. 86, 45 (1963)
14. Bernlohr, R.W., Novelli, G.D., Nature 184, 1256 (1959)
15. Vinter, V., in: "The Bacterial Spore", 73, ed. Gould, G.W., Hurst, A., Academic Press, London (1969)
16. Aronson, A.I., Fitz-James, P.C., J. Mol. Biol. 33, 199 (1968)
17. Sadoff, H.L., Celikkol, E., Engelbrecht, H.L., Proc. Natl. Ac. Sci. US 66, 844 (1970)
18. Sadoff, H.L., Celikkol, E., in: "Spore Research 1971", 59, ed. Barker, A.N., Gould, G.W., Wolf, J., Academic Press, London (1971)
19. Leighton, T.J., Doi, R.H., J. Biol. Chem. 246, 3189 (1971)
20. Aronson, A.I., Rosas del Valle, M., Biochim. Biophys. Acta 87, 267 (1964)
21. Aronson, A.I., J. Mol. Biol. 11, 576 (1965)
22. Kobayashi, Y., Spores V, 269 (1972)
23. Vold, B.S., Spores VI, 282 (1975)
24. Chambliss, G.H., Legault-Demare, L., Spores VI, 314 (1975)
25. Doi, R.H., Igarashi, R.T., Proc. Natl. Ac. Sci. US 52, 755 (1964)
26. DiCioccio, R.A., Strauss, N., J. Mol. Biol. 77, 325 (1973)

27. Sumida-Yasumoto, C., Doi, R.H., J. Bact. 117, 775 (1974)
28. Jeng, Y.H., Doi, R.H., J. Bact. 119, 514 (1974)
29. Jeng, Y.H., Doi, R.H., J. Bact. 121, 950 (1975)
30. Jacob, F., Monod, J., J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
31. Walter, G., Seifert, W., Zillig, W., Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 240 (1968)
32. Bolle, A., Epstein, R.H., Salser, W., J. Mol. Biol. 33, 339 (1968)
33. Douthitt, H.A., Halvorson, H.O., Science 153, 182 (1966)
34. Tsuji, S., Suzuki, K., Imahori, K., Agr. Biol. Chem. 39 1581 (1975)
35. Schaeffer, P., Millet, J., Aubert, J.-P., Proc. Natl. Ac. Sci. US 54, 704 (1965)
36. Losick, R., Sonenshein, A.L., Nature 224, 35 (1969)
37. Losick, R., Shorenstein, R.G., Sonenshein, A.L., Nature 227, 910 (1970)
38. Sonenshein, A.L., Losick, R., Nature 227, 906 (1970)
39. Losick, R., Sonenshein, A.L., Shorenstein, R.G., Hussey, C., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 443 (1970)
40. Hussey, C., Losick, R., Sonenshein, A.L., J. Mol. Biol. 57, 59 (1971)
41. Hussey, C., Pero, J., Shorenstein, R.G., Losick, R., Proc. Natl. Ac. Sci. US 69, 407 (1972)
42. Bonamy, C., Hirschbein, L., Szulmajster, J., J. Bact. 113, 1296 (1973)
43. Testa, D., Rudner, R., Nature 254, 630 (1975)
44. Leighton, T.J., Freese, P.K., Doi, R.H., Warren, A.J., Kelln, R.A., Spores V, 238 (1972)
45. Doi, R.H., Leighton, T.J., Spores V, 225 (1972)
46. Millet, J., Kerjan, P., Aubert, J.P., Szulmajster, J., FEBS-Lett. 23, 47 (1972)
47. Halvorson, H.O., J. Appl. Bact. 20, 305 (1957)
48. Aronson, A.I., Colloque International C.N.R.S. sur la "Regulation de la Sporulation Microbienne", Gif-sur-Yvette, Conférences et Communications, 28 (1973) und persönliche Mitteilung
49. Fuchs, E., Zillig, W., Hofschneider, P.H., Preuss, A., J. Mol. Biol. 10, 546 (1964)
50. Chamberlin, M., Berg, P., Proc. Natl. Ac. Sci. US 48, 81 (1962)
51. Babinet, C., Biochem. Biophys. Res. Comm. 26, 639 (1967)

52. Zillig, W., Zechel, K., Halbwachs, H.J., Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 351, 221 (1970)
53. Avila, J., Hermoso, J.M. Vinuela, E., Salas, M., Eur. J. Biochem. 21, 526 (1971)
54. Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., Bautz, E.K.F., Nature 221, 43 (1969)
55. Zillig, W., Hölzel, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 312, 140 (1958)
56. Duffy, J.J., Petrusek, R.L., Geiduschek, E.P., Proc. Natl. Ac. Sci. US 72, 2366 (1975)
57. Stetter, K.O., persönliche Mitteilung
58. Alberts, B.M., Amodio, F.J., Jenkins, M., Gutmann, E.D., Ferris, F.L., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 289 (1968)
59. Schaller, H., Nüsslein, C., Bonhoeffer, F.J., Kurz, C., Nietzschmann, I., Eur. J. Biochem. 26, 474 (1972)
60. Heil, A., Zillig, W., FEBS-Lett. 11, 165 (1970)
61. Zechel, K. persönliche Mitteilung
62. Zechel, K., Thesis, Universität München (1971)
63. Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V., Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815 (1967)
64. Boyd, D.H., Zillig, W., Scaife, F.J.G., Mol. Gen. Genet. 130, 315 (1974)
65. Sober, H.A., ed.: "Handbook of Biochemistry and Selected Data for Molecular Biology", 2nd ed., The Chemical Rubber Co., Cleveland (1972)
66. Zillig, W., persönliche Mitteilung
67. Seifert, W., Qasba, P., Walter, G., Palm, P., Schachner, M., Zillig, W., Eur. J. Biochem. 9, 319 (1969)
68. Fuchs, E., Thesis, Universität München (1965)
69. Grunberg-Manago, M., Ochoa, S., J. Am. Chem.Soc. 77, 3165 (1955)
70. Stetter, K.O., Zillig, W., Eur. J. Biochem. 48, 527 (1974)
71. Remold-O'Donnell, E., Zillig, W., Eur. J. Biochem. 7, 318 (1969)
72. Srinivasan, V.R., persönliche Mitteilung
73. Sippel, A., Hartmann, G., Biochim.Biophys. Acta 157, 218 (1968)
74. Chamberlin, M., Ann. Rev. Biochem. 43, 721 (1974)
75. Tjian, R., Losick, R., Proc. Natl. Ac. Sci. US 71, 2872 (1974)

76. Segall, J., Tjian, R., Pero, J., Losick, R., Proc. Natl. Ac. Sci. US 71, 4860 (1974)
77. Whiteley, H.R., Hemphill, H.E., Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 647 (1970)
78. Domingo, E., Escarmis, C., Warner, R.C., J. Biol. Chem. 250, 2866 (1975)
79. Rabussay, D., Zillig, W., Herrlich P., Virology 41, 91 (1970)
80. Hinkle, D.C., Chamberlin, M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 65 (1970)
81. Schäfer, R., Zillig, W., Zechel, K. Eur. J. Biochem. 33, 207 (1973)
82. Schäfer, R., Zillig, W., Zechel, K., Ciba Found. Symp. 7, 41 (1972)
83. Mitra, S., Zubay, G., Landy, A., Biochem Biophys. Res. Comm. 67, 857 (1975)
84. Brehm, S.P. LeHegarar, F., Hoch, J., J. Bact. 120, 1443 (1974)
85. Brehm, S.P., LeHegarar, F., Hoch, J., J. Bact. 124, 977 (1975)
86. Fukuda, R., Keilman, G., McVey, E., Doi, R.H., Spores VI, 213 (1975)
87. Linn, T., Greenleaf, A.L., Losick, R., J. Biol. Chem. 250, 9256 (1975)
88. Nishimoto, H., Takahashi, I., Can. J. Biochem. 52, 966 (1974)
89. Greenleaf, A.L., Linn, T.G., Losick, R., Proc. Natl. Ac. Sci. US 70, 490 (1973)
90. Greenleaf, A.L., Losick, R., J. Bact. 116, 290 (1973)
91. Stragier, P., Brevet, J., Hirschbein, L., Colloque International C.N.R.S. sur la "Regulation de la Sporulation Microbienne", Gif-sur-Yvette, Conferences et Communications 21, (1973)
92. Holland, M.J., Whiteley, H.R., Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 462 (1973)
93. Rhaese, H.J., Schubert, M., Schwulera, U., FEBS-Lett. 44, 94 (1974)
94. Zubay, G., Schwartz, D., Beckwith, J., Proc. Natl. Ac. Sci. US 66, 104 (1970)
95. Brevet, J., Sonenshein, A.L., J. Bact. 112, 1270 (1972)
96. Brevet, J., Molec. Gen. Genet. 128, 223 (1974)
97. Milanesi, G., Brevet, J., Nucleic Acids Res. 1, 397 (1974)
98. Murray, C.D., Pun, P., Strauss, N., Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 295 (1974)

99. Klier, A., Thesis, Universität Paris (1975)
100. Orrego, C., Kerjan, P., Manca de Nadra, M.C., Szulmajster, J., J. Bact. 116, 636 (1973)
101. Iwakura, Y., Ito, K., Ishihama, A., Molec. Gen. Genet. 133, 1 (1974)
102. Bøvre, K., Lozeron, H.A., Szybalski, W., Meth. in Virology V, 271 (1971)
103. Opara-Kubinska, Z., Kubinski, H., Szybalski, W., Proc. Natl. Ac. Sci. US. 52, 923 (1964)
104. Summers, W.C., Anal. Biochem. 33, 459 (1970)
105. Ackermann, H.W., Smirnoff, W.A., Bilsky, A.Z., Can. J. Microbiol. 20, 29 (1974)
106. Hemphill, H.E., Whiteley, H.R., Bacteriol. Rev. 39, 257 (1975)
107. Fuchs, E., Milette, R.L., Zillig, W., Walter, G., Eur. J. Biochem. 3, 183 (1967)
108. Miller, J.H., "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor (1972)
109. Dische, Z., Mikrochemie 8, 4 (1930)
110. Marmur, J., Doty, P., J. Mol. Biol. 5, 109 (1962)
111. Schildkraut, C.L., Marmur, J., Doty, P., J. Mol. Biol. 4 430 (1962)
112. Studier, F.W., J. Mol. Biol. 11, 373 (1965)
113. Abelson, J., Thomas, C.A., J. Mol. Biol. 18, 262 (1966)
114. Palm, P., persönliche Mitteilung
115. Gillespie, D., Spiegelman, S., J. Mol. Biol. 12, 829 (1965)
116. Schäfer, R., Zillig, W., Eur. J. Biochem. 33, 215 (1973)
117. Milette, R.L., Trotter, C.D., Herrlich, P., Schweiger, M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 135 (1970)
118. Mailhammer, R., Yang, H.L., Reiness, G., Zubay, G., Proc. Natl. Ac. Sci. US. 72, 4928 (1975)
119. Duffy, J.J., Geiduschek, E.P., J. Biol. Chem. 250, 4530 (1975)
120. Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, L., Nature 228, 227 (1970)
121. Lämmli, U.K., Nature 227, 680 (1970)
122. Air, G.M., Harris, J.I., FEBS-Lett. 38, 277 (1974)
123. Lill, U.I., Behrendt, E.M., Hartmann, G.R., Eur. J. Biochem. 52, 411 (1975)
124. Bordier, C., FEBS-Lett. 45, 259 (1974)

125. Jendrisak, J.J., Burgess, R.R., Biochemistry 14, 4639 (1975)
126. Klier, A.F., Lecadet, M.M., Dedonder, R., Eur. J. Biochem. 36, 317 (1973)
127. Maia, J.C.C., Kerjan, P., Szulmajster, J., FEBS-Lett. 13, 269 (1971)
128. Hermoso, J.M., Avila, J., Jimenez, F., Salas, M., Biochim. Biophys. Acta 277, 280 (1972)
129. Krakow, J.S., von der Helm, K., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 73 (1970)
130. Nakamoto, T., Fox, C.F., Weiss, S.B., J. Biol. Chem. 239, 167 (1964)
131. Sarkar, N., Paulus, H., Nature New Biol. 239, 228 (1972)
132. Bendis, I.K., Shapiro, L., J. Bact. 115, 848 (1973)
133. Yelton, D.B., Thorne, C.B., J. Virol. 8, 242 (1971)
134. Rexer, B., Zillig, W., unveröffentlicht
135. Mangel, W.F., Chamberlin, M.J., J. Biol. Chem. 249, 3002 (1974)
136. Kerjan, P., Szulmajster, J., FEBS-Lett. 5, 288 (1969)
137. Shorenstein, R.G., Losick, R., J. Biol. Chem. 248, 6163 (1973)
138. Cohen, A., Silberstein, Z., Mazor, Z., Biochim. Biophys. Acta 294, 442 (1973)
139. Cohen, A., Silberstein, Z., Mazor, Z., Spores V, 247 (1972)
140. Louis, B.G., Fitt, P.S., Biochem. J. 127, 69 (1972)
141. Küntzel, H., Schäfer, K.P., Nature New Biol. 231, 265 (1971)
142. Dunn, J.J., Bautz, F.A., Bautz, E.K.F., Nature New Biol. 230, 94 (1971)
143. Hattori, J., Ben-Ze-ev, H., Silberstein, Z., Tesone, C., Torriani, A., J. Bact. 124, 542 (1975)
144. Klier, A., Lecadet, M.M., Eur. J. Biochem. 47, 111 (1974)
145. Chamberlin, M.J., in: "RNA-Polymerases", Cold Spring Harbor (1976), im Druck
146. Linn, T.G., Greenleaf, A.L., Shorenstein, R.G., Losick, R., Proc. Natl. Ac. Sci. US. 70, 1865 (1973)
147. Losick, R., Ann. Rev. Biochem. 41, 409 (1972)
148. Duie, P., Kaminski, M., Szulmajster, J., FEBS-Lett. 48, 214 (1974)
149. Tjian, R., Stinchcomb, D., Losick, R., J. Biol. Chem. 250, 8824 (1975)
150. Szulmajster, J., Colloque International C.N.R.S. sur la "Regulation de la Sporulation Microbienne, Gif-sur-Yvette, Conférences et Communications, 45, (1973)

151. Roberts, J., Nature 224, 1168 (1969)
152. Kawamura, F., Ito, J., Virology 62, 414 (1974)
153. Kawamura, F., Ito, J., Spores VI, 231 (1975)
154. Kerjan, P., Szulmajster, J., Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 1079 (1974)
155. Rhaese, H.J., Dichtelmüller, H., Grade, R., Eur. J. Biochem. 56, 385 (1975)
156. Rhaese, H.J., Groscurth, R., FEBS-Lett. 44, 87 (1974)
157. Rhaese, H.J., Dichtelmüller, H., Grade, R., Groscurth, R., Spores VI, 335 (1975)
158. Hanson, R.S., Spores VI, 318 (1975)
159. Bernlohr, R.W., Haddox, M.K., Goldberg, N.D., J. Biol. Chem. 249, 4329 (1974)
160. Paulus, H., Sarkar, N., in: "Control of Transcription", 21, ed. Biswas, B.B., Mandal, R.K., Stevens, A., Cohn, W.E., Plenum Press, New York (1974)
161. Srinivasan, V.R., Halvorson, H.O., Nature, 197, 100 (1963)
162. Srinivasan, V.R., Nature 209, 537 (1966)
163. Rabussay, D., Thesis, Universität München (1970)
164. Schäfer, R., Thesis, Universität München (1972)
165. Marmur, J., J. Mol. Biol. 3, 208 (1961)
166. Saito, H., Miura, K.I., Biochim. Biophys. Acta 72, 619 (1963)
167. Charney, J., Tomarelli, R.M., J. Biol. Chem. 171, 501 (1947)
168. Salser, W., Meth. in Virology V, 293 (1971)
169. Heil, A., Thesis, Universität München (1973)
170. Mirrault, M.E., Scherrer, K., Eur. J. Biochem. 23, 372 (1971)
171. Stelma, G.N., Sadoff, H.L., J. Bact. 116, 1001 (1973)
172. Sheldrick, P., Szybalski, W., J. Mol. Biol. 29, 217 (1967)

Spores V: "Spores V", ed. Halvorson, H.O., Hanson, R., Campbell, L.L., American Society for Microbiology (1972)

Spores VI: "Spores VI", ed. Gerhardt, P., Costilow, R.N., Sadoff, H.L., American Society for Microbiology (1975)

Lebenslauf

Name: Bernhard Ulrich Rexer

Geburtsdatum: 01.09.1945

Geburtsort: Schärding/Inn

Eltern: Richard Rexer, Oberlehrer; Berta Rexer, geb. Dorfer, Hausfrau

Heirat: 1972, mit Ursula Rexer, geb. Lederer

Schulen:

- 1952-1956 Ev. Volksschule Arnbach/Bad.-Württ.
- 1956-1965 Gymnasium Neuenbürg/Bad.-Württ.
- 1965 Abitur

Studium:

- 1965 Beginn des Biochemie-Studiums an der Universität Tübingen
- 1965-1967 Unterbrechung des Studiums (Wehrdienst)
- 1967-1970 Fortsetzung des Biochemie-Studiums an der Universität Tübingen
- 1970-1971 Chemiestudium an der Universität München
- 1971-1972 Biochemie-Studium an der Universität Tübingen
- 1972 Biochemische Diplomarbeit
"Regulation der Aktivität der UDP-Glucuronyltransferase in Rattenleber-Mikrosomen" unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. K. W. Bock am Institut für Toxikologie, Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. Remmer)
- 1973-1976 Dissertationsarbeit
"Struktur und Aktivität der DNA-abh. RNA-Polymerase aus vegetativen und sporulierenden Zellen von *B. cereus*" unter Anleitung von Prof. Dr. W. Zillig, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
- März 1976 Teilnahme am EMBO-Kurs "Advanced Molecular Genetics", Genf.

Dissertationsdruck
GmbH & Co. KG.

Schadel & Wehle

8 München 40 Amalienstr. 81 Telefon 089/288 784/2. Etage